

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Búzafajták ozmotikus- és szárazságstressz alatti akklimatizációja,
a glutation transzferázok szerepe a stresszválaszban

Doktori (PhD) értekezés

Gallé Ágnes

Témavezető:
Dr. Csiszár Jolán
egyetemi docens

Biológia Doktori Iskola

Szegedi Tudományegyetem
Természettudományi és Informatikai Kar
Növénybiológiai Tanszék

Szeged
2010.

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	- 2 -
Rövidítések jegyzéke	- 4 -
1. Bevezetés	- 5 -
2. Irodalmi áttekintés	- 8 -
2.1. A vízhiány stresszfolyamatokat aktivál.....	- 8 -
2.2 Vízhiány hatása a fiziológiai paraméterekre	- 10 -
2.2.1. Szárazságstressz hatása a növények növekedésére	- 10 -
2.2.2. Szárazságstressz hatása a növények vízháztartására	- 10 -
2.2.3. Szárazságstressz hatása a sztómakonduktanciára	- 10 -
2.2.4. Az abszcizinsav bioszintézise és szerepe a szárazságstressz alatt	- 11 -
2.2.5. Szárazságstressz hatása a szenescenciára	- 13 -
2.3. Oxidatív stressz és védekező mechanizmusok.....	- 14 -
2.3.1. Az oxidatív stressz	- 14 -
2.3.2. A glutation.....	- 15 -
2.3.3. A glutation transzferáz izoenzimek.....	- 16 -
2.3.4. A GSTk funkciói	- 18 -
2.3.4.1. Enzimatis funkciók.....	- 18 -
2.3.4.2. Nem enzimatis funkciók.....	- 20 -
2.3.5. A Phi és tau csoportú GSTk	- 22 -
2.3.6. Zéta és théta csoport.....	- 25 -
2.3.7 Dehidroaszkorbát reduktáz (DHAR) és lambda csoport.....	- 25 -
2.3.8. Tetraklórhidrokinon dehalogenáz és mikroszómális GST csoport	- 26 -
2.3.9. A GSTk transzkripció szabályozása	- 26 -
2.3.10. A GSTk poszttranszlációs modifikációja.....	- 27 -
3. Célkitűzések	- 28 -
4. Anyagok és módszerek	- 30 -
4.1. A kísérleti növények bemutatása, a nevelés, és az abiotikus stressz kezelés paraméterei .	- 30 -
4.1.1. A felhasznált búzafajták	- 30 -
4.1.2. Búza csíranövények nevelési körülményei	- 30 -
4.1.3. Kalászoló búza növények nevelési körülményei	- 30 -
4.1.4. Kísérletek felosztása.....	- 31 -
4.1.4.1. Ozmotikus stressz kezelés.....	- 31 -
4.1.4.2. Az ABS bioszintézis gátlásának vizsgálata ozmotikus stressz kezelés alatt.....	- 31 -
4.1.4.3. A szárazságstressz indukálása	- 32 -
4.2. Relatív növekedés meghatározása.....	- 32 -
4.3. Relatív víztartalom (RWC) meghatározása.....	- 32 -
4.4. A vízpotenciál mérése nyomáskamra módszerrel	- 33 -
4.5. Sztómakonduktivitás mérés.....	- 33 -
4.6. Pigmenttartalom meghatározás	- 33 -
4.7. A malondialdehid tartalom meghatározása	- 34 -
4.8. ABS kivonása és meghatározása.....	- 34 -
4.9. Aldehid oxidáz aktivitás detektálása	- 35 -
4.10. GST és GPOX aktivitás meghatározása.....	- 35 -
4.11. GSTszekvencia keresés és filogenetikai analízis	- 36 -
4.12. RNS izolálás, cDNS átírás	- 36 -

4.13. QRT-PCR (kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció)	- 38 -
4.14. Statisztikai kiértékelés	- 39 -
5. Eredmények	- 40 -
5.1. Szárazságstressz hatása kalászos búza növények hozamára és zászlós leveleinek öregedési folyamatára, fiziológiai paramétereire és GST expressziójára.....	- 40 -
5.1.1. Ezerszemtömeg	- 40 -
5.1.2. Klorofill a+b, karotinoid és MDA tartalom	- 41 -
5.1.3. GST és GPOX aktivitás a zászlóslevélen.....	- 45 -
5.1.4. GST kódoló szekvenciák összehasonlítása és filogenetikai vizsgálata.....	- 47 -
5.1.5. GST génexpresszió tanulmányozása a szárazságstressz alatt	- 51 -
5.2. Ozmotikus stressz hatása búza csíranövények fiziológiai paramétereire és GST expressziójára	- 54 -
5.2.1. Növekedési és vízháztartási paraméterek változása PEG-kezelt búza növényekben .	- 54 -
5.2.2. GST aktivitás és expresszió változása PEG-kezelt búza növények gyökerében.....	- 58 -
5.3. Ozmotikus stressz hatása az abszeizinsav tartalomra, bioszintézisére és a sztómakonduktivitásra.....	- 61 -
5.4. Ozmotikus stressz hatása a glutation peroxidáz és glutation transzferáz aktivitásra	- 67 -
5.5. Az ABS bioszintézis gátlás hatása <i>GSTU1</i> és <i>U2</i> gének expressziójára.....	- 67 -
6. Eredmények értékelése	- 70 -
6.1. Szárazságstressz hatása különböző szárazságtűrésű búza növények zászlós leveleinek öregedési folyamatára, fiziológiai paramétereire és GST expressziójára	- 70 -
6.2. Ozmotikus stressz hatása búza csíranövények fiziológiai paramétereire és GST expressziójára	- 74 -
6.3. Az ABS bioszintézis gátlás hatása <i>GSTU1</i> és <i>U2</i> gének expressziójára.....	- 76 -
7. Összefoglalás	- 78 -
7.1. Szárazságstressz hatása különböző szárazságtűrésű búza növények zászlós leveleinek öregedési folyamatára, fiziológiai paramétereire és GST expressziójára	- 78 -
7.2. Ozmotikus stressz hatása búza csíranövények fiziológiai paramétereire és GST expressziójára	- 79 -
7.3. Az ABS bioszintézis gátlás hatása <i>GSTU1</i> és <i>U2</i> gének expressziójára.....	- 80 -
8. Summary	- 81 -
8.1. Effects of drought stress on flag leaf senescence, physiological parameters and GST (glutathione transferase) expression of wheat cultivars with different drought susceptibility .	- 81 -
8.2. Effects of osmotic stress on the physiological parameters and GST expression of wheat cultivars	- 82 -
8.3. Effects of ABS biosynthesis inhibition on the expression of <i>GSTU1</i> and <i>U2</i> genes	- 83 -
9. Felhasznált irodalom	- 84 -
10. Publikációs lista	- 97 -
11. Köszönetnyilvánítás	- 100 -

Rövidítések jegyzéke

ABS	abszcizinsav
AAO	aldehid oxidáz
CDNB	1-klór-2,4-dinitrobenzol
DHAR	dehidroaszorbát reduktáz
DPA	days post anthesis – az antézis után eltelt napok száma
GST	glutation transzferáz
PEG	polietilén glikol 6000
GSH	redukált glutation
GSSG	glutation diszulfid, oxidált glutation
GPOX	glutation peroxidáz
MDA	malondialdehid
NCED	9-cisz-epoxikarotin dioxigenáz
QRT-PCR	kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció
ROS	reaktív oxigén származékok

1. Bevezetés

A helyhez kötött életmódú magasabb rendű növények folyamatos kapcsolatban állnak környezetükkel, erősen függnék a hatásaitól. A környezeti hatások befolyásolják fejlődésüket, növekedésüket, és meghatározzák produktivitásukat. Abban az esetben, ha ezek a környezeti hatások az adott fajra jellemző optimum értékeken kívül esnek (túl alacsony, illetve túl magas hőmérséklet, kiegyenlítetlen ásványi táplálkozás, nem megfelelő fényviszonyok, vízhiány), a növény stresszhelyzetbe kerül. A stressz által kiváltott növényi védekező reakciók hatékonysága alapján megkülönböztethetünk stresszérzékeny és stressztűrő növényeket. A növénynemesítés legfontosabb célja éppen az, hogy stresszérzékeny haszonnövényeinket fokozatosan stressztűrővé alakítsa. Ennek megvalósításához elengedhetetlen a stresszválaszok összetevőinek pontos megismerése. A hatékony növénynemesítés szempontjából fontos olyan paraméterek azonosítása, melyek felelősek az előnytelen környezeti tényezők közötti hozamstabilitás megőrzéséért. A természetes adaptáció, illetve a kezdetben tudattalan, majd tudatos nemesítési tevékenység sok, stresszorokkal szemben rezisztens faj, fajta létrejöttét eredményezte a növényvilágban. A nemesítési cél eléréséhez jó kiindulási pontot jelenthetnek ezek az ellenálló fenotípussal rendelkező vonalak, amelyek a kedvezőtlen körülmények alatt is nagyfokú termésstabilitással rendelkeznek. Elsőként azokat a fiziológiai paramétereket kell azonosítani, amelyek stresszhelyzetben nemcsak az egyed túlélését, hanem a hozamcsökkenés elkerülését is biztosítják. A hatékony fiziológiai stresszválaszokért minden esetben gének, géncsoportok tehetőek felelőssé, amelyek pontos ismerete nagymértékben elősegítheti a nemesítési folyamatot.

A világon az egyik legértékesebb és legnagyobb területen termesztett gabonaféle a búza. Széles körű elterjedését a búzafajok és fajták változatos éghajlati igénye és jó alkalmazkodóképessége tette lehetővé. Hazánkban a szántóföld negyedét foglalja el, emiatt a termelése meghatározó gazdasági súllyal rendelkezik. A búza esetében különösen igaz, hogy a természetes evolúciós folyamatok mellett az emberi beavatkozás is szerepet játszott a genetikai alapok megváltoztatásában. A természetes és mesterséges szelekciónak, keresztezéses nemesítésnek köszönhetően számos, stresszorokkal szemben különösen ellenálló fajta jött létre, amelyek kedvezőtlen körülmények közötti termésstabilitásáért felelős folyamatok pontos megismerése további nemesítési folyamat alapját képezheti.

A búzanövények hozamának két meghatározó eleme a megtermékenyítés folyamata és a szemfeltöltődés. A szemfeltöltődés során tápanyagtranszport történik a fejlődő búzaszemekbe a zászlóslevélből, amely ezzel párhuzamosan szabályozott öregedési folyamaton esik át. A vízhiány befolyásolhatja a zászlóslevél szenescenciáját és így hozamcsökkenést okozhat. A növényekben mind a vízhiány, mind az öregedési folyamatok során toxikus metabolitok (pl. krotonátok, lipidaldehidek és lipidperoxidok) akkumulálódhatnak, melyek hatékony eltávolításában jelentős szerepet játszanak a glutation transzferázok (GSTk). A talaj vízpotenciáljának csökkenése után a GST enzimek által katalizált detoxifikáció fokozódása a stresszvédekezés meghatározó tényezőjévé válhat. Ezért kísérleteink egyik célja volt párhuzamot vonni a szárazság esetén fellépő élettani jelenségek és a GST aktivitás között, lehetőség szerint azonosítani olyan GST transzkriptumokat, amelyeknek szerepe lehet a szenescencia folyamatában és/vagy a vízhiány kivédésében.

Munkánk során különböző, szárazságra érzékeny és szárazságot jól toleráló búzafajtákat hasonlítottunk össze. Szárazságot tűrő fajtában lehetett mérni a legmagasabb GST és glutation peroxidáz (GPOX) aktivitás értékeket mind a kontroll, mind a szárazságnak kitett mintákban (cv. Plainsman), illetve jelentős indukciót tapasztaltunk stresszhatásra (pl. a Kobomugi fajta esetében). Az antéziskor (virágzás során a pollen érésekor) mért magas aktivitás, illetve jelentős indukció összekapcsolható a hatékony oxidatív stressz elleni védekezéssel, sejtszintű detoxifikálással. A két, szárazság hatására is változatlan ezerszemtömeget mutató fajtában (Plainsman és Kobomugi) eltérő *GST* gének indukálódtak, de a vizsgált fajták többségében a legkiemelkedőbb transzkript szint emelkedéseket két génnél (*TaGSTF6* és *TaGSTU1B/C*) figyeltünk meg, ami a kódolt fehérjék stresszválaszban betöltött jelentős szerepére enged következtetni. A szárazságra érzékeny, termés csökkenéssel reagáló GK Öthalom fajtában pl. a szárazság hatására változatlan GST aktivitás és a lipidperoxidáció megemelkedett szintje arra utal, hogy a fajta oxidatív stressz elleni védekezése kevésbé volt sikeres.

A kalászos növényeken végzett kísérletek időigényesek, ezért kísérleteinket folyadékkultúrában nevelt búza csíranövényeken is elvégeztük, a stresszt a tápoldat ozmolaritásának megemelésével indukálva. A kétféle kísérleti rendszer alkalmazásával kapott eredményeinket összevetettük és megállapítottuk, hogy bizonyos gének termékei mind a két stresszválaszban szerepet játszanak (pl. *TaGSTU1B/C* allélok), míg más esetben a kalászos növényekben a szárazság erőteljesebb génexpresszió emelkedést okozott (pl. *TaGSTF6* és

TaGST19E50 gének esetében). Ozmotikus stressz hatására a legkisebb *GST* expresszió növekedést a *GST* aktivitás mérésekkel összhangban a Plainsman fajtában, a legjelentősebb emelkedést a Kobomugiban és GK Öthalomban tapasztaltuk.

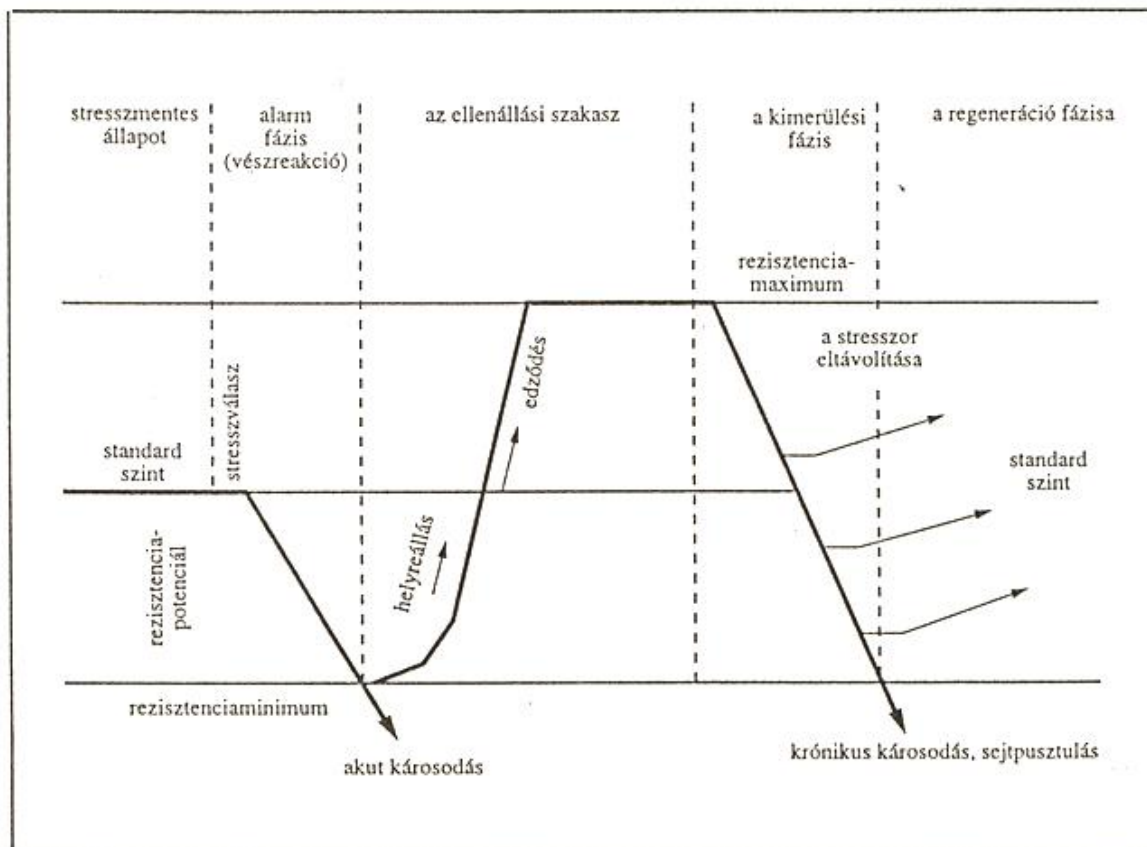
Eredményeinket az abszcizinsav szint és -bioszintézis alakulásával összefüggésben is vizsgáltuk. A stresszéletten terén hasznosítható eredményeink a búza nemesítők számára is új ötlettel szolgálhatnak a szárazsággal szemben ellenálló fajták előállításához.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A vízhiány stresszfolyamatokat aktivál

A Földön élő növényeknek változatos környezeti körülményekhez kell alkalmazkodni. A helyhez kötött életmódjuk miatt a környezeti tényezők változásainak szélsőségesen ki vannak téve, a külső hatások gyakran fejlődésük és produkciójuk limitáló tényezőivé válnak. A stresszorok az emberi táplálkozás alapját jelentő haszonnövényeinkre is jelentős hatással vannak, amelyek leggyakrabban biomasszájuk és ezen belül terméshozamuk csökkenésével reagálnak. A kedvezőtlen környezeti tényezők közül a talaj vízpotenciálja vált a gabonatermesztés egyik limitáló tényezőjévé. A vízhiányra a növények metabolizmusuk, fiziológiai folyamataik és morfológiájuk megváltoztatásával reagálhatnak. Ennek az akklimatizációs folyamatnak a komponensei a növekedés megváltozása, hajtás-gyökér arány eltolódása, a fotoszintézis intenzitásának regulációja, illetve a különböző, stressz által indukált ozmotikumok, védő fehérjék termelése. Ezek mögött a folyamatok mögött génexpressziós változások állnak (hormon bioszintézis enzimek, stresszfehérjék, transzkripciós faktorok stb. transzkript szint változásai). A szárazságstressz tolerancia sok gén által meghatározott, összetett tulajdonság. A szárazság elleni védekezési mechanizmusaik alapján három csoportba sorolhatjuk a növényeket: az első csoportba tartozó növények képesek a sejtek hidratált állapotát megőrizni, őket izohidrikus növényeknek nevezzük. A második csoportba tartozó növények a szöveti deszikkációt képesek tolerálni, ezt a csoportot toleránsnak nevezzük. A harmadik kategória a szárazság elkerülő növények csoportja, melyek a száraz periódus előtt befejezik az életciklusukat (Tari és mtsai. 2003).

Az izohidrikus és a szöveti desszikkációt toleráló növények a szárazságra sajátos tünetekkel reagálnak. Kedvezőtlen környezeti tényezők különböző válaszokat indukálnak a növényekben, de a specifikus reakciókban bizonyos általános vonások is felfedezhetők. A növényen szembeni fokozott igénybevétel a funkciók kezdeti destabilizációját követően egy normalizálódáson át az ellenállóság fokozódásához vezet, majd a tűréshatár túllépésekor tartós károsodást vagy akár pusztulást is okoz (Larcher 1987). Ezeket a tüneteket összefoglaló néven adaptációs szindrómának nevezzük, amely egymást követő folyamatokból épül fel: Canon-féle vészreakció (másnéven alarm fázis), ellenállás vagy rezisztencia, kimerülés szakasza (2.1. ábra).



2.1. ábra: A növényi stresszválasz általános sémája (Szigeti, 1998)

Kontinentális éghajlati viszonyok között a gabonanövények egyedfejlődésének különböző szakaszaiban alakulhatnak ki stresszt okozó környezeti feltételek. A növényi védekezésnek eltérő stratégiákat kell követni az életciklus különböző periódusaiban fellépő környezeti terhelés ellen, hogy az optimális védelmet biztosítani tudja. Csíranövények esetében, a szárazságstresszel szembeni akklimatizációs folyamat célja az alap metabolizmus visszaállítása és a szövetek, sejtek optimális anyagcseréjének fenntartása. Amennyiben a szárazság a kalászoló növényeket érinti, a hangsúly áttevődik az egyed fennmaradásáról a fajfenntartás biztosítására. A középpontba a szemtermés érése, az optimális szemfeltöltődés kerül. Ennek biztosítására átalakul az egyed metabolizmusa; megindulnak a lebontó folyamatok; megkezdődik - és gyakran gyorsabb lefutású - a szenescencia. Az eltérő funkcióknak megfelelően különböző életszakaszokban az azonos fehérjék különböző expressziós mintázatot mutathatnak. A szárazságstressz akklimatizációs folyamatának teljes megismeréséhez szükség van a védekezésben érintett komponensek pontos azonosítására, az életszakaszok megfelelő funkciójuk felderítésére, és szabályozásuk alapelemeinek megismerésére.

2.2 Vízhiány hatása a fiziológiai paraméterekre

2.2.1. Szárazságstressz hatása a növények növekedésére

A környezeti vízhiány kialakulásának sebessége és intenzitása nagymértékben befolyásolja a növények válaszreakcióit. A környezetből felvehető víz mennyiségének csökkenése a növényi szervezetben vízhiányt okoz. Amennyiben a vízhiány lassan alakul ki, és a növény csírázási, vagy korai növekedési periódusában jelentkezik, a stressz befolyásolhatja a növények növekedését, a levelek expanszióját. Közepes vízhiány befolyásolja a gyökérnövekedést is, általában a hajtás-gyökér arány megváltozik. A gyökérhossz és az oldalgyökök száma stressz hatására emelkedhet, vagy kevésbé redukált, mint a levél térfogat növekedése.

2.2.2. Szárazságstressz hatása a növények vízháztartására

A szárazságstressz egyik jellemzője más stresszekkel szemben, hogy fokozatosan alakul ki, a tünetek a stresszhatás tartamától függően erősödnek. Ha a stresszor gyors és intenzív, vagy a növény növekedésének befejeződése után lép fel, a növény gyors és hatékony válaszreakcióra kényszerül. Az egyik ilyen válaszreakció a sztómazáródás, ami a vízpotenciál és a relatív víztartalom csökkenés elkerülését eredményezheti szárazságstressz alatt.

2.2.3. Szárazságstressz hatása a sztómakonduktanciára

A sztómakonduktancia paramétere a sztómák nyitott állapotával arányos. Több növényfaj esetében kimutatták a vízstressz hatására történő sztómakonduktancia csökkenést, például: búzafajtákban (Quarrie és Jones 1979), napraforgóban, csillagfürtben, szőlőben, eukaliptuszban (Quick és mtsai. 1992), kukoricában (Tardieu és mtsai. 2006). A vízmegvonást követő 4-5. napra az említett növényfajokban szignifikáns különbségek mutatkoztak, a vízpotenciállal negatív korrelációban. A gázcserenyílások gyors zárása a szöveti vízpotenciál megtartását segítheti, ez azonban hatással van a szövetek CO₂ ellátottságára (Hideg és mtsai. 2006) Ennek a folyamatnak a regulációja részletesen ismert folyamat, és a legfontosabb komponense az abszcizinsav (Tardieu és mtsai. 2006).

2.2.4. Az abszcizinsav bioszintézise és szerepe a szárazságstressz alatt

Az abszcizinsav (ABS) egy fitohormon, amely a szárazságstresszel szembeni adaptációban kulcsszerepet játszik (Shinozaki és Yamaguchi-Shinozaki, 2000, Tari és mtsai. 2003). A stressz szignálként emlegetett ABS a gyökérből a xilémen keresztül jut el a hajtás különböző részeibe, ahol szabályozza a transzspirációs vízvesztéséget és a levélnövekedést. A stressz hatására megemelkedő koncentrációjú ABS a gyökér-szövetekből származik, ahol ABS szintézis tekintetében mind a gyökér sztéle, mind a kortex szövetek azonos kapacitással rendelkeznek, még 50 %-ot meghaladó vízvesztés esetén is (Hartung és mtsai. 1999). Mivel a hajtás target sejtjeinek reakciója koncentrációfüggő, ezért számos faktor létezik, amelyek biztosítják a konstans xilém ABS tartalmat. A xilém ABS hormonszintjét befolyásoló tényezők: az apoplastikus áramlás különböző útjai, a xilém parenchima és a szállítónyalábok közötti áramlás, és a kortexben a glükóz-észter konjugátumból, β -D-glükozidázok katalizálásával felszabaduló ABS (Hartung és mtsai. 2002).

A hajtásban a hormon az apoplastba jut és a gázcsere nyílások záródását idézi elő, ugyanis serkenti a kálium kiáramlást a zárósejtekből (Büßis, 1998). Így csökken a párologtatás és a sztómakonduktivitás, ami a szárazságstressz szempontjából a hormon egyik legfontosabb hatása. Az ABS a gyökerekben *de novo* szintetizálódik a vízpotenciál csökkenését követően.

Kalászos növények esetében a zászlóslevél (kalász alatti levél) ABS termelése erősen összefügg a szemfeltöltődéssel, ugyanis innen történik a hormon transzportja a szemekbe. A fejlődő szemekben az abszcizinsav tartalom egy ponton ugrásszerűen megemelkedik, majd egy maximum elérése után fokozatosan lecsökken (Yang és mtsai. 2001). A szemfeltöltődés alatt a zászlóslevélből a szemekbe irányuló tápanyagtranszport sikerének egyik meghatározó faktora az ABS csúcs lezajlásának üteme (Guóth és mtsai. 2009). Ezért stressz esetén a zászlóslevelek sikeres akklimatizációja és optimális ABS termelése a terméshozam szempontjából nagy jelentőségű.

Az abszcizinsav bioszintézisnek a zeaxantin a kiindulási vegyülete, amely kétlépéses epoxidációját a zeaxantin epoxidáz (ZEP) enzim katalizálja, melyet a keletkező karotinoidok oxidatív hasadása követ (9-cisz-neoxantin, 9-cisz-violaxantin). 9-cisz-neoxantinból egy dioxigenáz (NCED - 9-cisz-epoxikarotin dioxigenáz) hatására xantoxin képződik, ami oxidáció után abszcizin-aldehiddé alakul (2.2. ábra). Az abszcizin-aldehid, az aldehid oxidáz hatására alakul abszcizinsavvá (Cutler és Krochko 1999). A molibdén hidroxilázok csoportjába tartozó

aldehid oxidáz (AAO) számos aldehid és aromás heterociklikus vegyületek oxidatív hidroxilációját katalizálja (Hille, 1996). Cowan (2000) aldehid oxidáz mutánsok segítségével kimutatta, hogy AB-aldehidből abszcizinsav kialakulhat AB-alkoholon keresztül is, aktív aldehid oxidáz jelenléte nélkül. Az ozmotikus stressz *Arabidopsis* növényben indukálta a dioxigenáz (NCED) aktivitását, amely a stresszhatás kezdeti szakaszában az ABS szintézis sebesség-meghatározó lépése. Az ennek hatására megemelkedett ABS szint több enzim indukcióját váltja ki, illetve visszahat az aldehid oxidáz expressziójára, amely az ABS szintézis további szakaszában a sebesség-meghatározó lépés (Xiong és mtsai. 2002). Stresszhatásra bekövetkező abszcizinsav termelés esetében az aldehid oxidáz aktivitás fokozódása mellett stressz indukálta izoenzimek jelentek meg borsó esetében (Zdunek és Lips 2001). A stressz alatti jelátvitel folyamatokban jelentős szerepet játszik az abszcizinsav, a legtöbb stressz kivédése szempontjából fontos gének expresszióját indukálja. Az indukált gének funkciójuk szerint két csoportra oszthatók: az egyik csoportba tartoznak a funkcionális fehérjék pl.: LEA (Late Embryogenesis Abundant, Galau és mtsai. 1986), RAB (Responsive to ABscisic acid), prolin (Székely és mtsai. 2008) és dehidrin fehérjék, amelyek védik a deszikkációtól a fehérjéket, a másik csoportba a regulátor fehérjék tartoznak, mint pl. protein-kinázok (Gómez-Cadenas és mtsai. 1998).

Az antézis (virágzás) vagy szemfeltöltődés alatti szárazságstressz felgyorsíthatja a szenescencia folyamatát és a fotoszintézis redukcióját eredményezheti, illetve indukálhatja szénhidrátok hatékonyabb remobilizációját a szemtermésbe (Yang és mtsai. 2006).

2.3. Oxidatív stressz és védekező mechanizmusok

2.3.1. Az oxidatív stressz

A vízhiányt gyakran követi oxidatív stressz, amelynek során a megszokottnál nagyobb mennyiségben keletkeznek reaktív oxigén gyökök (ROS) az oxigén részleges redukciójával. A sikeres akklimatizáció egyik legfontosabb feltétele a membránokat, nukleinsavakat, fehérjéket degradáló és inaktíváló reaktív oxigénformák eltávolítása. A kioltó mechanizmusokat túllépő oxidatív stressz a membránlipidek peroxidációját, a proteinek oxidációját, az enzimgátlást, valamint a DNS és RNS károsodását okozhatja és végül programozott sejthalálhoz vezethet. Leggyakrabban szuperoxid gyökök ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoxil gyökök (HO_2^{\cdot}), H_2O_2 és hidroxil gyökök (OH^{\cdot}) jönnek létre. Amellett, hogy a reaktív oxigénformák oxidatív károsodásokat okozhatnak, kulcs szerepük van patogén támadás, környezeti stresszek elleni védelemben, a programozott sejthalál és különböző fejlődési folyamatok jelátvitelében, (Mittler és mtsai. 2004, Miller és mtsai. 2010).

A mérgező alkotóelemek detoxifikálása kritikus a sejtek és az élőlény túlélése szempontjából. A legtöbb élőlény kifejlesztett egy hatékony rendszert a mérgező vegyületekkel szemben, amely képes az átalakításukra, metabolizmusukra, és az eltávolításukra. Ehhez a három fázishoz három enzimesoport kapcsolódik, az első fázist képző enzimek a szubsztrátok transzformációját végzik pl.: különböző funkcionális csoportokat alakítanak ki (citokróm P450 monooxygenáz). A második fázist olyan konjugáló enzimesoportok képviselik, mint glükózil transzferázok és glutation transzferázok csoportjai, amelyek a transzformáció során kialakított funkcionális csoportokat használják a további konjugáció célpontjául, amely végeredményeképpen vízben könnyebben elegyedő és kevésbé mérgező metabolitok jönnek létre. A detoxifikáció harmadik fázisában ATP függő membránpumpák felismerik és kompartmentumokba szállítják a konjugátumot (Marrs, 1996).

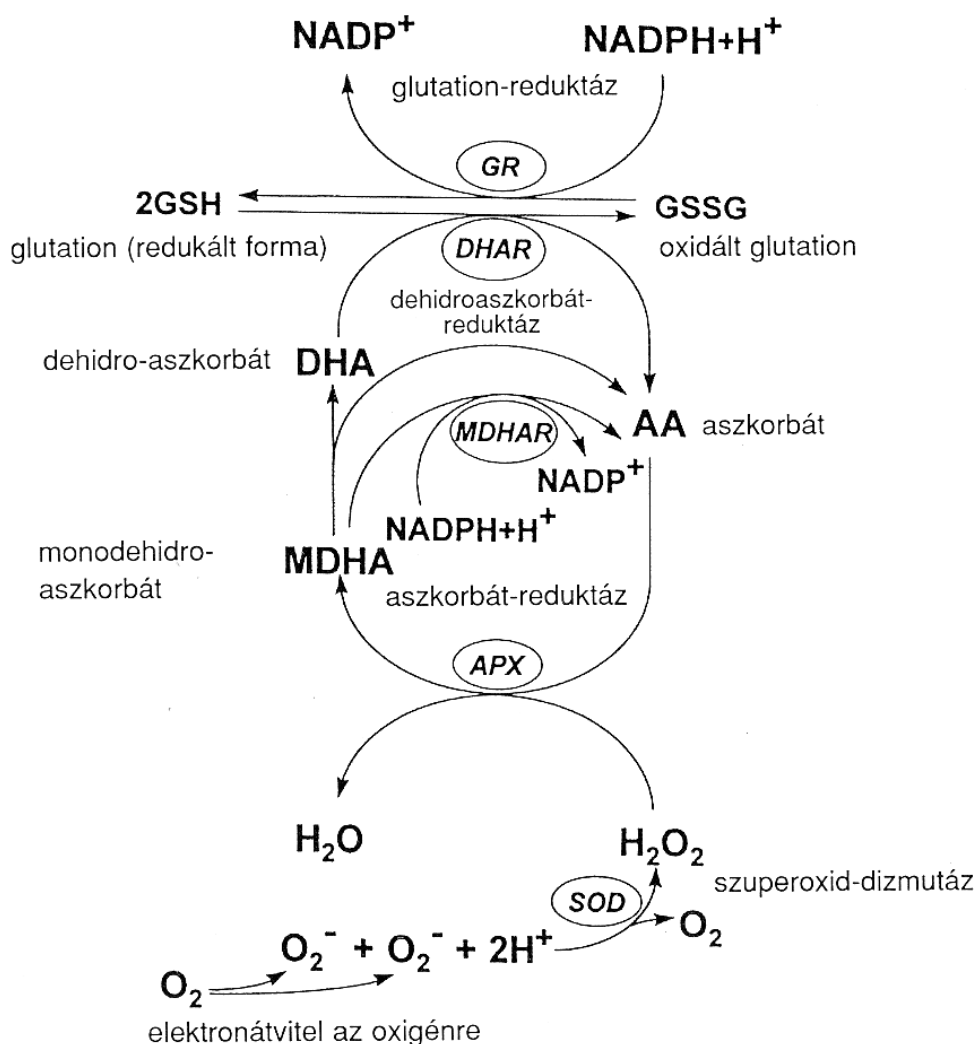
2.3.2. A glutation

Az aszkorbát, karotinoidok és az α -tokoferol mellett a glutation egy nagy jelentőségű növényi endogén antioxidáns (Alscher és mtsai. 1989), amely a stressz elleni védekezésben szerepet játszik. A redukált glutation a növényekben nagy mennyiségben jelenlévő, alacsony molekulásúlyú tiol vegyület (May és mtsai. 1998). Stressz-mentes állapotban elsősorban redukált formában van jelen (GSH), és csak kis része van oxidált állapotban (GSSG) (Noctor és mtsai. 2002). Amellett, hogy az aszkorbinsav – glutation ciklusban redukálja a dehidroaszkorbinsavat, a GSH nem enzimatikusan is reagál a szinglet oxigénnel, a szuperoxiddal és a hidroxil gyökkel (Kuźniak és mtsai. 2001), illetve szubsztrátul szolgál számos antioxidatív védekezési mechanizmusban: konjugátumot képez káros elektrofil metabolitokkal, részt vesz a szabadgyökök kioltásában és redukálja a membránokra ártalmas lipidperoxidokat. A sejten belüli glutation mennyiség, illetve a redukált és oxidált glutation aránya az oxidatív stressz elleni védekezés fontos eleme (Tari és mtsai. 2002; Kocsy és mtsai. 2004).

Azonban a GSH nem csak a direkt ROS detoxifikáción keresztül fejt ki a hatását, hanem a redox jelátvitelben betöltött szerepének köszönhetően különböző védekező reakciókat is aktivál (Foyer és Noctor, 2005) és részt vesz a génexpresszió szabályozásában (Wingate és mtsai. 1988).

A variábilis funkcióknak megfelelően számos glutation függő antioxidáns enzim ismert, az egyik a glutation transzferázok (GST) csoportja.

A glutation (GSH) szerepet játszik a ROS koncentráció szabályozásában mind direkt, mind indirekt módon (Foyer és Noctor, 2005). Az aszkorbát-glutation ciklus tagjaként részt vesz a többlet H_2O_2 eltávolításában (Noctor és Foyer, 1998, 2.3. ábra). Optimális kondíciók mellett is keletkezik a sejtekben GSSG a glutation oxidált formája, amelyet redukált glutationná (GSH) elsősorban a glutation reduktáz enzim alakít vissza, de normál körülmények között a GSH szint kialakításában részt vesz a GSH és GSSG transzport, a GSH bioszintézis és degradáció is (Szalai és mtsai. 2009). A glutation nemcsak a direkt detoxifikáció révén fejt ki védő hatását, hanem a redox jelátvitel részeként számos védekezési mechanizmus indukálására képes (Foyer és Noctor, 2005). A GSH a glutation peroxidáz (GPOX) enzim szubsztrátjaként is részt vesz a H_2O_2 eltávolításában. A H_2O_2 mellett herbicidek, lipidperoxidok és metilglioxál eltávolításában is részt vesz a GSH, amely reakciókat a glutation transzferáz enzim katalizálja (Marrs és mtsai 1996).

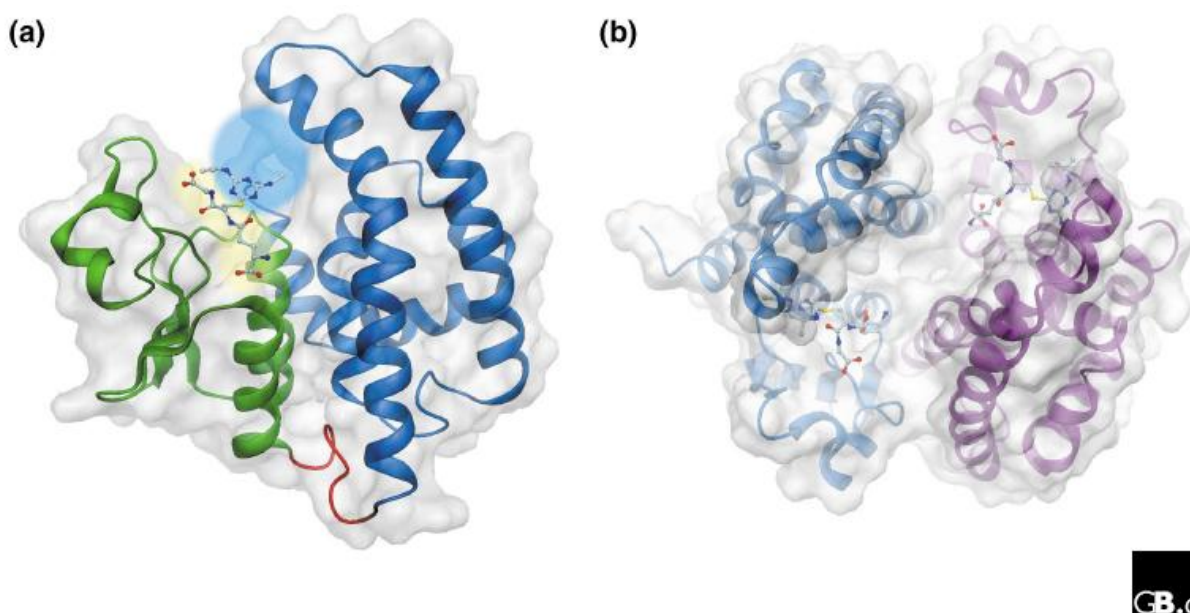


2.3. ábra: Az aszkorbát-glutation ciklus fontosabb összetevői (Dudits és Heszky, 2003).

2.3.3. A glutation transzferáz izoenzimek

A GST-k az egész élővilágban elterjedt fehérjék, kimutatták őket állatokban, növényekben és gombákban is. Az első növényi GST-ket gyomirtószer-rezisztens kukoricából izolálták (Frear és Swanson, 1970). Gabonafélékben különösen nagy mennyiségben fordulnak elő, akár az összes fehérje 2%-át is kitehetik (Pascal és Scalla 1999, Dixon és mtsai. 2002a). Az expressziójuk mértéke a különböző növényi szövetekben is nagy eltéréseket mutathat, illetve érzékenyek biotikus és abiotikus stresszre és stresszhez kapcsolódó metabolitok széles skálájára. A GSTk transzkripcióját indukálták szintetikus auxinok (pl.:2,3-diklórfenoxiecetsav) és természetes hormonok: auxin, szalicilsav, metil-jázmonát, abszizinsav (Ulmasov és mtsai.

1994), de nehézfémek (pl.: kadmium, cink, réz) és reaktív oxigén formák (hidrogén-peroxid) is a GST gének indukcióját eredményezték (Ulmasov és mtsai. 1995, Kieffer és mtsai. 2009). A GSTk bizonyos csoportjai jellemzően alfa helikális szerkezetű monomerek (Banerjee és Goswami 2010), de a legtöbb GST két alegységből áll, amelyek molekula tömege 25-27 kDa és homo-, illetve heterodimereket képeznek. A fehérjedimerek mindkét tagjának a katalitikus egysége két komponensből áll (2.4. ábra). Az első, a fehérjék N-terminális végén helyet foglaló konzervatív GSH-specifikus régió, a „G site” nevet viseli. A második funkcionális egység, a hidrofób szubsztrát kötő régió, a „H site”, ami nagyobb strukturális variabilitást mutat és a C terminális doménen foglal helyet. A két domén között egy 5-10 aminosavból álló variábilis, összekötő (linker) régió foglal helyet (Dixon és mtsai. 2002a).



2.4. ábra: A GST fehérjék felépítése, monomer (a) és dimer (b) formában. Az (a) ábrán zöld szín jelöli a C terminális domént, kék az N terminális domént, piros az összekötő régiót (Dixon és mtsai. 2002a).

Általában jellemző, hogy nagyon diverz enzimcsalád, melynek bizonyos képviselői között előfordul, hogy csupán 10% a hasonlóság (Edwards és mtsai. 2000). A szekvencia motívumaik alapján csoportosították őket, négy nagy diverzitást mutató, sok izoenzimet tartalmazó csoportot (phi, zeta, tau és théta), és négy kisebb csoportot (dehidroaszorbát reduktáz, lambda, tetraklórhidrokinon dehalogenáz és mikroszómális GST) határoztak meg (2.1 táblázat, Dixon és mtsai. 2002b, Soranzo és mtsai. 2004).

GST csoportok (a jelenleg használatban lévő elnevezések)	Gének jelölése búzában
phi	<i>TaGSTF</i>
tau	<i>TaGSTU</i>
zéta	<i>TaGSTZ</i>
théta	<i>TaGSTT</i>
dehidroaszkorbát reduktáz	<i>TaGSTDHAR</i>
lambda	<i>TaGSTL</i>
tetraklórhidrokinon dehalogenáz	<i>TaGSTTCHQD</i>
mikroszómális GST	<i>TaGSTM</i>

2.1. táblázat: a glutation transzferáz izoenzimcsalád csoportjainak elnevezése, jelölésük.

A GSTk nagy része nem tartalmaz szubcelluláris target szekvenciát, így feltehetően a citoszolban akkumulálódnak. Kivételt képeznek *Arabidopsis thaliana*-ban a DHAR és lambda csoport bizonyos tagjai (*AtGSTDHAR3*, *AtGSTL2*), amelyek N-terminálisan kloroplasztisz és mitokondrium target szekvenciát tartalmaznak (Dixon és mtsai. 2002a). Szintén kloroplasztisz lokalizációra utaló N-terminális target szekvenciát tartalmaz a phi csoportú *GSTF8* (Thatcher és mtsai. 2007). Eddigi adatok alapján a GSTk többsége citoszolban fordul elő, de bizonyos organellek is nagy mennyiségben tartalmaznak GST izoenzimeket. Például *Arabidopsis* *GSTF2*, *F9*, *F10*, *U19*, *U20*, *L2* és *DHAR3* a kloroplasztiszban (Zybalov és mtsai. 2008), a *GSTTF5* és *GSTF6* a mitokondriumban (Heazlewood és mtsai. 2004) és a *GSTF2*, *F6*, *F7*, *F9* és *F10* a vakuolumban (Carter és mtsai. 2004) található meg. Kloroplasztisz lokalizációt mutatott a *Prosopis juliflora* *GSTU1* enzim transzgénikus dohány növényekben (George és mtsai. 2010).

2.3.4. A GSTk funkciói

2.3.4.1. Enzimatikus funkciók

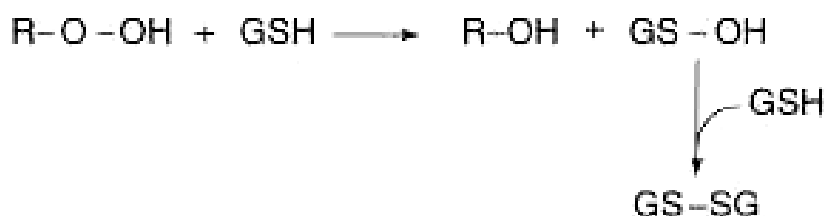
Detoxifikáció GSH konjugációval

Az első ismert aktivitás, amelyről a nevüket is kapták az enzimek, a fitotoxikus metabolitok glutation konjugációval történő detoxifikálása. A növényi GSTk GSH konjugáló aktivitása az enzimes csoport 1970-ben történt azonosítása óta ismert. Frear és Swanson (1970) második fázisú detoxifikáló enzimekként azonosították, mivel a fotoszintetikus gyomirtószeres detoxifikálásában fontos konjugáló aktivitás biztosítja a gyomirtószerekkel szembeni

szelektivitást. A mérgező metabolitok ill. herbicidek glutation konjugátumait az ABC transzporterek juttatják a vakuolumba, amelyek ezzel citotoxicitásukat elveszítik. A GSH konjugáló aktivitás esetében széles a GSTk szubsztrát specifitása, a szubsztrátok közös tulajdonsága, hogy egy kettős kötéssel is rendelkező szénatomhoz egy elektronegatív csoport kapcsolódik (pl: -NO₂, -CHO, -COCH₃, -CN vagy -CONH₂).

GPOX aktivitás

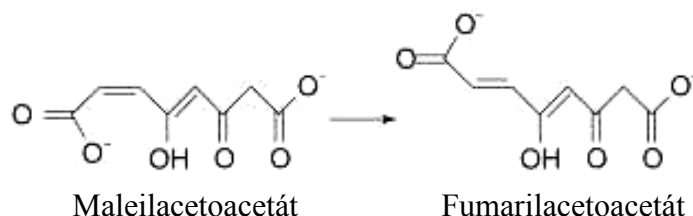
Bizonyos GST izoenzimek glutation peroxidáz aktivitással is rendelkeznek, amelyek a lipid hidroperoxidok redukcióját katalizálják monohidroxi-alkoholokká (2.5. ábra). Ez az aktivitás a stressztoleranciában nagy jelentőséggel bír, a GST/GPOX túlexpresszázó dohányok toleránsabbnak mutatkoztak abiotikus stresszorokkal szemben, mint a transzgént nem tartalmazó csíranövények. A transzgént hordozó növények több oxidált glutationt (GSSG) tartalmaztak, amely a hatékonyan működő GPOX aktivitás indikátora. (Roxas és mtsai. 1997). A megnövelt GPOX aktivitással rendelkező dohány csíranövények magasabb metabolikus aktivitással, hatékonyabb antioxidatív kioltó mechanizmusokkal (az aszkorbát ciklus enzimei hatékonyabban működtek), és alacsonyabb malondialdehid tartalommal rendelkeztek, mint a vad típus. Azok a dohány csíranövények, amelyek GST/GPOX enzimek génjét túlexpresszálták, abiotikus stresszekkel szemben ellenállóbbak voltak. (Roxas és mtsai. 2000).



2.5. ábra: Glutacion peroxidáz katalizálta hidroperoxid átalakítása monohidroxi-alkohollá (Dixon és mtsai. 2002b).

Izomerizáció katalizálása

Elsősorban izomeráz aktivitása különbözteti meg a többi GST-től a széles körben elterjedt zéta csoportot. A csoport tagjai katalizálják a maleilacetoacetát glutation függő konverzióját fumarilacetoacetáttá (2.6. ábra), amely reakció a tirozin és fenilalanin degradáció egy lépése, ezáltal valószínűsíthető, hogy szerepük összefonódik a tirozin degradációval és a nitrogén metabolizmussal (Dixon és mtsai. 2006).



2.6. ábra: Maleilacetoacetát átalakítása fumarilacetoacetáttá *cis-transz* izomerizációval (Dixon és mtsai. 2002b).

Dehidroaszkorbát reduktáz (DHAR) aktivitás

Glutation függő oxidoreduktáz aktivitással rendelkeznek a DHAR csoportba tartozó GST enzimek. A tiol transzferáz aktivitásuk mellett katalizálják a dehidroaszkorbát redukcióját aszkorbinsavvá több lehetséges reakcióúton keresztül (Dixon és mtsai. 2002b).

2.3.4.2. Nem enzimatis funkciók

Bax inhibitor funkció

Egy 2000-ben megjelent publikáció alapján egy paradicsomból származó Bax inhibitor (Bcl-2-kapcsolt X fehérje inhibitor) gént transzformáltak élesztőbe, amely glutation konjugáló és glutation peroxidáz aktivitással rendelkezett, és expressziója növelte a sejtek túlélését (Kampranis és mtsai. 2000). *Arabidopsisban* szintén kimutatták egy GST fehérjéről, hogy gátolja a Bax-közvetített programozott sejthalált (Pan és mtsai. 2001).

Ligandin funkció

Elsőként a növényi GST enzimek a különböző herbicidekkel és mérgező metabolitokkal szembeni detoxifikáló aktivitásuk miatt voltak a figyelem középpontjában. Mivel az antocianinok színe pH függő, a lilás színük csak akkor figyelhető meg, ha a vakuolumba kerülnek. Viszont GST hiányában a citoplazmában halmozódnak fel, ahol a magasabb pH érték miatt bronzvörös

színt mutatnak. Az antociainin vakuoláris transzportjában deficiens növények a bronzvörös szín mellett nekrozist is mutatnak és a növekedésük redukált. Kukoricában egy tau csoportú GST-ről leírták, hogy katalizálja egy antocianin (cianidin 3-glükózid) konjugációját glutationnal, amely ezek után egy tonoplasztban található Mg-ATP függő glutation csatornán keresztül transzportálódik a vakuolumba (Marrs és mtsai. 1995). Hasonló funkciókkal rendelkező GST-t azonosítottak petúniában (Alfenito és mtsai. 1998), szőlőben (Ford és mtsai. 1998), és *Arabidopsis*-ban is (Smith és mtsai. 2003).

A GST az antocianin transzportban betöltött pontos funkcióját 2000-ben azonosították petúniában. Kimutatták, hogy planáris struktúrával rendelkező flavonoidok gátolták a GST enzimek konjugáló aktivitását és megváltoztatták a mobilitásuk poliakrilamid gélben, ami alapján feltételezték, hogy a phi és tau csoportú GSTk kötő fehérjeként (ligandinként) vesznek részt az antocianinok szállításában (Marrs és mtsai. 1995, Mueller és mtsai. 2000, Smith és mtsai. 2003).

Egy 2008-ban megjelent cikk alapján a GSTk ligandinként szerepet játszanak a porfirin metabolizmusban és transzportban is (Dixon és mtsai. 2008). A szabad porfirinek és a prekursoraik zömmel a kloroplasztisban lokalizáltak, míg a legtöbb phi és tau csoportú GST citoszolikus. Ahhoz hogy a porfirin bioszintézisben betöltött szerepük részleteire fény derüljön kukorica GST géneket *Escherichia coli*-ban expresszáltattak, mely során kiderült, hogy ZmGSTU1 fehérje a porfirin szintézis két intermediérének glutation konjugációját katalizálja.

GSTk kapcsolata a szenescenciával

A lebontó folyamatok mellett bizonyos szenescencia-specifikus fehérjék megjelenése szintén az öregedési folyamat megindulásának szignáljai lehetnek.

2005-ben Kuneida és mtsai. árpában kimutatták - párhuzamosan a klorofill bomlással - a CDNB szubsztráttal szembeni GSH konjugáló aktivitás emelkedését. Meghatározták továbbá, hogy a szenescencia hatására az árpa egy tau csoportú GST génjének (Senescence Induced GST, *SIGST*, AF109194) transzkript szintje jelentős indukciót mutat. Ehhez a tau csoportú árpa génhez nukleinsav sorrend hasonlósága alapján hozzárendelték a legközelebb álló ismert szekvenciát, amit egy búza gén három allélja képvisel: *TaGSTU1A/B/C*.

Egy 2007-ben publikált micro-array kísérletben búza zászlóslevelet vizsgálták virágzás után. Öt GST génre specifikus próba esetében tapasztaltak szignifikáns változást az öregedés alatt. Egy tau és két phi csoportú gén transzkript szintje emelkedett folyamatosan a zászlóslevél

szeneszcencia alatt és egy zéta csoportú gén expressziója ugrásszerűen indukálódott az öregedési folyamat végén (Gregersen és Holm, 2007).

2.3.5. A Phi és tau csoportú GSTk

A specifikusan növényekben előforduló, nagy variabilitást mutató phi és tau GSTk sok különböző xenobiotikum GSH konjugációját képesek elvégezni (2.7. ábra), biztosítva ezzel a herbicidek szelektivitását. A két csoport tagjai homo- vagy heterodimert alkotnak. Az egy csoportba tartozó GSTk még akkor is képezhetnek dimert, ha aminosav sorrendjük nagy különbségeket mutat (Dixon és mtsai. 2002a). Nagyrészt szolubilisek, élő sejtben a citoszolban találhatóak. Az *Arabidopsis* genomjában a phi és tau csoportú GST gének csoportokat képeznek a kromoszómán, ez az elrendeződés génduplikáció eredményeként alakulhatott ki (Dixon és mtsai. 2002a). Funkciójukat tekintve nagy hasonlóságot mutatnak a gyógyszer metabolizmusban szerepet játszó állati GST-kel (Edwards és Dixon, 2005). A phi és tau csoport GSH konjugáló aktivitása a GSTk között a legmagasabb (Edwards és Dixon, 2000), azonban részt vesznek a sejt normál metabolizmusának fenntartásában oxidatív stressz esetén glutation függő peroxidáz aktivitásuk révén is (Dixon és mtsai. 2002a), továbbá flavonoid kötő fehérje mivoltukban (Mueller és mtsai. 2000), stressz szignál fehérjeként (Loyall és mtsai. 2000), és Bax-inhibitoroként (Kampranis és mtsai. 2005).

A különböző stresszhatások kivédésében betöltött szerepüket széles körben vizsgálták, és sok esetben találtak összefüggést az aktivitás és/vagy génexpresszió mértéke és a stressztolerancia között. A phi csoportba tartozó AmGSTF1 például az ecsetpázsit herbicid-rezisztens fajtájában jelentős aktivitást mutat, míg a szenzitív formákban alacsonyabb aktivitást detektáltak (Cummins és mtsai. 1999). A különböző GST csoportok eltérő indukcióját különböző herbicid kezelésekre először *Arabidopsisban* mutatták ki (DeRidder és mtsai. 2002). Egy gén, a tau csoportú *AtGSTU19* mutatott indukciót minden tesztelt herbicidre, de öt phi, egy théta és egy tau csoportú GST gén is indukálódott a herbicid kezelésekre.

A búza phi csoportú GSTk herbicid indukálhatóságát Cummins és mtsai. (2003) vizsgálták meg. Hat fehérje katalitikus aktivitását határozták meg (2.7. ábra). Közülük három (TaGSTF2, TaGSTF3 és TaGSTF6) magas GPOX aktivitással rendelkezik. TaGSTF1, TaGSTF6 amellet, hogy magas konjugáló aktivitással rendelkeztek a CDNB szubsztráttal szemben, érzékenyek bizonyultak flavonoid gátlásra is, ami a flavonoid transzportban betöltött lehetséges

ligandin szerepükre utal. A fent említett publikációkon kívül még számos tanulmány foglalkozik a phi és tau csoportú GSTk herbicid rezisztenciában betöltött szerepével. Összességében megállapítható, hogy a növényeknél egy GST csoportot vagy GST gént sem lehet egyedül a herbicid rezisztenciáért felelőssé tenni, a növényvédőszer kezelésre adott válaszok inkább fajspecifikusak és a sejt aktuális állapotától függnék (Basantani és Srivastava 2007).

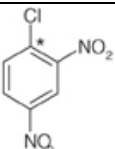

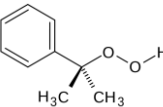
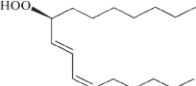
A tau csoportú GSTk jelentős szerepet játszanak az oxidatív stressz elleni védekezésben is, hiszen az oxidatív stressz során termelődő másodlagos metabolitokkal szemben is mutatnak konjugáló aktivitást (Roxas és mtsai. 1997; Kilili és mtsai. 2004). Öt különböző szubsztrátspecifitású tau csoportba tartozó paradicsom GST-ről bizonyosodott be, hogy heterodimer képzésére hajlamosak egy Bax-inhibitor GSTvel. Ezeknek a heterodimereknek a jelenléte transzgénikus élesztőben fokozta az oxidatív stressz elleni védekezést (Kampranis és mtsai. 2000). Négy tau csoportba tartozó búza GSTt azonosítottak Thom és mtsai (2002), akik meghatározták ezek szubsztrátspecifitását is (2.7. ábra). Kiemelkedően magas CDNB bontó aktivitással rendelkezik a TaGSTU2 fehérje. A TaGSTU1 enzim egy stresszmetabolit analóggal (krotonaldehiddel) szemben mutat a tau csoport többi tagjához viszonyítva kiemelkedő konjugáló aktivitást, ami utal az oxidatív stressz elleni védekezésben betöltött szerepére.

Exogén szalicilsav kezelés hatására indukálódtak a phi, tau és DHAR csoportú GSTk (Sappl és mtsai. 2004). A szalicilsav hasonló gének kifejeződését serkenti, mint bizonyos biotikus (patogén fertőzés) és abiotikus (magas sókoncentráció) stresszorok, így mimikálja azok hatásását. Patogén támadás kivédésében a különböző GST gének különböző szerepet játszanak, pl. dohány GSTU1 és GSTU3 fehérjék kifejeződése fokozódott gombatámadásra és a *GSTU1* „géncsendesített” növények erősebben fertőződtek a *Collectotrichum* gombafajokkal, mint a *GSTU3*, *GSTU2* és *GSTF1* gének transzlációjában gátolt vonalak (Dean és mtsai. 2005).

Wagner és mtsai (2004) *Arabidopsis thaliana* biotikus és abiotikus stresszre indukálódó phi, tau zeta és théta csoportú GSTk szubsztrát specifitását határozta meg. Ez alapján a phi csoportú GSTk több szubsztrátot fogadnak el, mint a tau csoportba tartozók. Meghatározták különböző stresszek (fitohormonok, herbicidek, oxidatív stressz, peronoszpóra fertőzés) hatását a phi és tau csoportba tartozó GSTk transzkript szintjére és megállapították, hogy egyes gének expressziója a stresszorok fellépése után is változatlan maradt (*AtGSTF9*, *AtGSTF10*, *AtGSTU2*, *AtGSTU13*), míg mások minden kezelésre indukálódtak (*AtGSTF6*), és voltak, amelyek transzkript szintje csak bizonyos stresszorokra emelkedett meg. Ez a kísérletsorozat is

bizonyította a phi és tau csoport rendkívüli diverzitását, ami nemcsak a széles szubsztrát spektrumukban, hanem a szabályozásuk variabilitásában is megmutatkozik.

A tau és a phi csoporton belül bizonyos, nagyfokú szekvencia hasonlóságot mutató tagok között előfordul funkcionális átfedés. Moons és munkatársai (2003) két olyan tau csoportú rizs GSTt vizsgáltak, amelyek azonos N-glikozilációs szignált hordoztak (nagy valószínűséggel a poszttranszlációs modifikációjuk hasonló), és teljesen konzervatív szubsztrát kötő helyekkel rendelkeztek, ami feltételezi a funkcionális hasonlóságukat. A két gén expressziós mintázatában hipoxia, nehézfém, só, polietilén glikol által indukált ozmotikus stressz, exogén H₂O₂ és ditiotreitől kezelésre csak kis különbségek mutatkoztak, ami funkcionális átfedésre utal. Viszont a két gén poliadenilációs szignálja eltéréseket mutatott, ami feltételezi, hogy különböző adenilációs folyamaton esnek át az mRNSeik.

Enzim aktivitás (nkat mg ⁻¹ fehérje)											
Tau csoport						Phi csoport					
Szubsztrát		TaGSTU1-1	TaGSTU2-2	TaGSTU3-3	TaGSTU4-4	TaGSTF1-1	TaGSTF2-2	TaGSTF3-3	TaGSTF4-4	TaGSTF5-5	TaGSTF6-6
GST aktivitás											
CDNB		1970	8140	30	657	2519	407	187	237	174	980
Krotonaldehid (stressz metabolit)		3,7	0,2	0,4	0,1	6,3	7,1	5,5	6,1	4,5	5,5
GPOX aktivitás											
Kumén- hidroperoxid		1,9	ND	1,1	2,3	3,8	50,0	90,0	9,7	3,5	16,7
Linolsav- hidroperoxid		0,7	0,3	1,5	3	1,3	63,0	236	3,2	1,8	2,6

2.7. ábra: Búza phi és tau csoportú GSTk katalitikus aktivitás értékei különböző szubsztrátokkal szemben (Thom és mtsai. 2002, Cummins és mtsai. 2003).

2.3.6. Zéta és théta csoport

A zéta és théta csoportú GSTk állatokban és növényekben konzerváltak és csekély GSH konjugáló aktivitással bírnak. A csoportok tagjai 50 kDa méretű dimert alkotnak. A théta csoportba tartozó GSTk erős glutation peroxidáz aktivitással rendelkeznek, oxidatív stressz során organikus hidroperoxidok redukcióját végzik. Ezt a csoportot elsőként *Arabidopsis*-ban azonosították az emlős théta csoportú GSTkhez mutatott hasonlósága alapján (Basantani és Srivastava 2007).

A tirozin degradációban jelentős szerepet játszó maleilacetoacetát izomeráz aktivitással a zéta csoportú GSTk rendelkeznek. A környezeti hatások széles spektruma hat inductívan a csoport tagjaira számos növényfajban. A zéta csoportot Board és mtsai. azonosították (1997). Szekvencia összehasonlítások és filogenetikai analízisek bebizonyították, hogy ez a csoport nagymértékben konzervatív az élővilágban, ami alapján valószínűsíthető, hogy metabolizmusban betöltött szerepe is azonos különböző élőlényekben.

Szegfűben a zéta csoportú GSTk a szeneszencia előrehaladtával indukciót mutattak, ami jól korrelál az aromás aminosavak degradációjában betöltött szerepükkel (Edwards és mtsai. 2000).

2.3.7 Dehidroaskorbát reduktáz (DHAR) és lambda csoport

Mindkét csoport tagjai tiol transzferázok, és közös bennük, hogy oxidoreduktáz funkciókat látnak el. Elsőként növényekben 2002-ben Dixon és mtsai. határozták meg ezeket a csoportokat. Az *Arabidopsis* dehidraszkorbát reduktáz és lambda csoportú GST enzimek nem rendelkeztek sem konjugáló aktivitással 1-klór-2,4-dinitrobenzol (CDNB), nitrobenzil kloriddal és benzil izotiocianáttal szemben, sem glutation peroxidáz aktivitással, ellenben tiol transzferáz aktivitást mutattak hidroxietil diszulfiddal szemben, illetve a DHAR csoport –ahogyan a nevében is benne van - dehidroaskorbát reduktáz funkcióval rendelkezik. Ebbe a csoportba tartozó GSTk a sejten belül a citoszolban és a kloroplasztisban fordulnak elő. A kloroplasztisban az askorbát regenerációját végzik, ami a fotoszintézisben betöltött szerepükre mutat rá. A citoszolikus dehidroaskorbát reduktázok és a lambda csoport tagjai indukciót mutatnak szárazságra, oxidatív stresszre és szalicilsavra. (Sappl és mtsai. 2004; Secenji és mtsai. 2010a).

2.3.8. Tetraklórhidrokinon dehalogenáz és mikroszómális GST csoport

A tetrahydrokinon dehalogenáz csoportba eddig egy *Arabidopsis thaliana*-ban azonosított GST tartozik. A fehérje membránban lokalizált, és a pentaklórfenol lebontásában játszik szerepet.

Szintén membrán kapcsoltak a mikroszómális glutation transzferáz csoport tagjai, melyek méretükben és struktúrájukban különböznek a többi GST csoporttól: 150-160 aminosavból állnak és a csoport bizonyos tagjai trimert alkotnak (Edwards és Dixon, 2005). Sok növényfajban a szolubilis GST enzimeknél alacsonyabb glutation konjugáló aktivitással rendelkeznek (Basantani és Srivastava, 2007).

2.3.9. A GSTk transzkripció szabályozása

A GST gének promóter régióiban található szabályozó elemek szerepet játszanak a GST gének transzkript szint emelkedésében. Kétszikűek GST promótereiben olyan reguláló szekvenciákat találtak, amelyek a különböző hormon kezelésekre, stresszhatásokra adott válaszokért felelősek. Ilyenek például az auxin, etilén, szalicilsav, hidrogén peroxid, hő sokk, nehézfém stressz és patogén támadás jelátvitelében szerepet játszó elemek (Itzhaki és mtsai. 1994; Ulmasov és mtsai. 1994; Droog és mtsai. 1995; Chen és Singh, 1999).

Az egyszikű *Triticum tauschii*-ban két tau csoportú GST gén (*TtGSTU1*, 2) promóter régiójának nukleinsav szekvenciáját határozták meg (Xu és mtsai. 2002). A start kodont 525 bázispárral megelőzi mindkét génben egy ERE (etilén responsive element) *cis*-ható elem és 230 bázispárral egy ABRE (ABA responsive element) motívum, amely az ABS jelátvitel legjobban tanulmányozott komponense (2.8. ábra). Az abszcizinsav nagyrészt transzkripció faktorok közvetítésével végzi a gének transzkripcionális aktiválását, ezek közül a bZIP transzkripció faktorok az ABRE motívum ACGT szekvenciáját ismerik fel.

3. Célkitűzések

A búza az egyik legérzékenyebb növényünk a vízellátás elégtelenségeivel szemben (Bray és mtsai 2000). A szárazság és ennek hatására a növényekben kialakuló vízhiány a búzafajták genetikai képességei megnyilvánulásának határt szabhat. Ezért fontos feladat a búza növények szárazság akklimatizációjának elemeit megismerni, stratégiáikat felderíteni.

Szárazságstressz hatására az GST izoenzimes család mind fehérje, mind expressziós szintű indukciója ismert. Kevésbé kutatott terület viszont, hogy a GST izoenzimes család mely tagjaihoz kapcsolható ez a jelenség, és búza növények esetében milyen életszakaszban, melyik GST csoport kap nagyobb hangsúlyt a stressz elleni védekezésben.

A GST aktivitás- és expresszióváltozás alapján irodalmi adatok szerint ismert, hogy szerepük van a szenescenciában. Megvizsgáltuk, milyen szerepet töltenek be a zászlós levelekben a korai szemfeltöltődési szakaszában, különböző szárazságtűrésű búzafajtákban.

A növények vízháztartását erősen befolyásolja a sztómák nyitott-zárt állapota, ami az ABS regulációja alatt áll. A stresszhatásra megemelkedő ABS tartalom számos stressz elleni védekezésben jelentős gén expresszióját indukálja. Kísérleteinkben fényt akartunk deríteni a GST expresszió és az ABS szint közötti kapcsolatra olyan búzafajták esetében, amelyek védekezésének jelentős eleme a GST izoenzimes család.

Dolgozatomban a következő kérdésekre kerestem választ:

1. Melyik fajtában mutat meghatározható változást a korai szemfeltöltődési periódus alatt a zászlóslevél szenescenciája, és hogyan módosul a folyamat szárazság hatására? Kimutatható-e összefüggés a vizsgált periódusban a szenescencia iniciációja és a GST aktivitás és -expresszió között?

2. Milyen indukciókat mutat a GST és GPOX aktivitás szárazság hatására a hozam alapján rezisztens és szenzitív búzafajtákon? A szárazság alatt is stabil ezerszemtömeget mutató fajtáknál milyen csoportú és melyik GST gének indukálódnak öntözésmegvonás következtében?

3. Párhuzamba hozható-e a kalászó növények szárazságstressz kezelése során megfigyelhető változásai a különböző szárazságtűrésű búzafajták csíranövény korban történő ozmotikus stressz kezelésével? Hogyan változik a búza csíranövények vízháztartása ozmotikus

stressz kezelés esetén, és van-e kapcsolat a fajták szárazságtűrése és ozmotikus stressz toleranciája között?

4. Milyen változások detektálhatóak a GST aktivitásban és a tau, phi és zeta csoportú gének expressziójában kontroll és ozmotikus stressz körülmények között?

5. Milyen tendencia mutatkozik meg a csíranövény és a kalászos búza ozmotikus stressz akklimatizációs folyamatában és GST indukciójában? Vannak-e jellemző különbségek az adott életszakaszokban adott válaszreakciók között?

6. Az izohidrikus és szöveti dehidrációt toleráló fajták akklimatizációs folyamata mutat-e különbségeket az abszcizinsav indukciójában? Az ABS tartalom változása mennyire függ a *de novo* bioszintézistől? Milyen jelentőséggel bír a GST expressziós regulációjában az ABS hormontartalom a jelentős GST indukciót mutató fajták esetében?

4. Anyagok és módszerek

4.1. A kísérleti növények bemutatása, a nevelés, és az abiotikus stressz kezelés paraméterei

4.1.1. A felhasznált búzafajták

A kísérletek során hat, eltérő eredetű és szárazságtűrősségi búzafajtát használtunk (*Triticum aestivum* cv. Plainsman, GK Öthalom, GK Élet, Mv Emese, Cappelle Desprez és *T. a.* Kobomugi tájfajta). Nemzetközileg ismerik, és széles körben használják szárazságstressz kísérletekben a Plainsman, Cappelle Desprez fajtapárost, amely párosból, az Amerikából származó Plainsman fajta extrém szárazságtűrést mutat, míg a francia Cappelle Desprez, szárazságra érzékeny. Mv Emese fajtát Martonvásáron nemesítették, jó hozamú, szárazságtűrő fajta. A GK Élet és a GK Öthalom bőven termő, Szegeden nemesített fajták, a GK Öthalom közepes szárazságtűrő, míg a GK Élet a hozama alapján szenzitívnek minősül. A Kobomugi Közép- Ázsiából származik, félsivatagi, nagyon száraz termőhelyhez adaptálódott tájfajta.

4.1.2. Búza csíranövények nevelési körülményei

A búzaszemek 1 órás folyóvízes átmosás után 24 óráig, nedves szűrőpapíron, 25 °C-on termosztátban csíráztak. A növények további nevelése 10 literes edényekben, Hoagland teljes tápoldatban (5 mM $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, 5 mM KNO_3 , 1 mM KH_2PO_4 , 2 mM MgSO_4 , 1 μM Fe-EDTA, 0,0475 μmol H_2BO_3 , 14,48 μmol MnCl_2 , 0,8148 μmol ZnCl_2 , 0,3731 μmol CuCl_2 , 0,001213 μmol Na_2MoO_4), 180 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fényintenzitás mellett, 12/12 óra fény/sötét megvilágítási periódussal, 24/19 °C nappali/éjszakai hőmérsékleten, üvegházi környezetben történt.

4.1.3. Kalászos búza növények nevelési körülményei

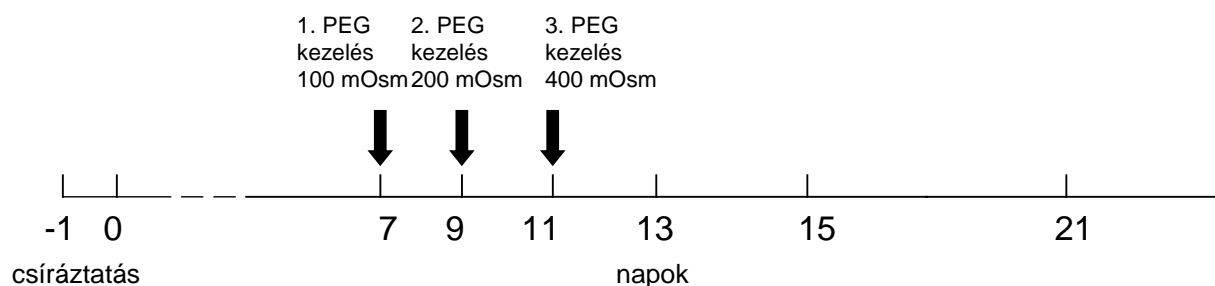
A kalászos növények neveléséhez használt talaj Terra típusú virágföld és marosi homok 50-50%-os elegye volt. A fekete polietilén cserepek 1600 g talajkeverék befogadására alkalmasak, 100%-os talaj nedvességtartalom esetén tömegük 2000 g, légszáraz állapotban 1400 g.

4.1.4. Kísérletek felosztása

Két kísérleti rendszert használtunk: egyrészt egy hetes búza csíranövényeket ozmotikus stressznek tettünk ki, másrészt kalászos búza növényeknél öntözésmegvonással szárazságstresszt indukáltunk.

4.1.4.1. Ozmotikus stressz kezelés

A búza csíranövények esetében az ozmotikus stresszt polietilén glikollal (PEG 6000-rel) indukáltuk. A csíranövények tápoldatának az ozmolaritását lépcsőzetesen emeltük meg: a vetés utáni 7. napon 100 mOsm-ra, majd, 9 és 11 napos csíranövény korban voltak tovább emeltük 200 mOsm és 400 mOsm-ra. A kezelés sémája, illetve a mintavételi időpontok a 4.1. ábrán láthatóak.



4.1. ábra: Fiatal növények ozmotikus stressz kezelésének vázlata. A csíranövények tápoldatának az ozmolaritását az inert PEG polimerrel kétnaponta lépcsőzetesen emeltük: a 7. napon 100 mOsm majd 200 és 400 mOsm értékeket alkalmazva.

4.1.4.2. Az ABS bioszintézis gátlásának vizsgálata ozmotikus stressz kezelés alatt

Az ABS bioszintézis jelentőségének vizsgálatakor egy hetes búza csíranövények tápoldatát beállítottuk 15 μ M fluridonnal (Sigma-Aldrich) egészítettük ki (a fluridon a fitoén desaturáz enzim gátlása révén gátolja az ABS szintézis útban a zéta karotin bioszintézist). A fluridon és ozmotikus stressz együttes alkalmazásakor 200 mOsm-ra emeltük a tápoldat ozmolaritását PEG-gel, illetve a 200 mOsm PEG kezelés hatását önmagában is vizsgáltuk a Hoagland tápoldatban nevelt, kontroll növényekhez viszonyítva. A mintavétel a kezelés után 24 órával történt.

4.1.4.3. A szárazságstressz indukálása

A kontroll és stresszelt növények öntözésének szétválasztása az ún. „kalászhasban” állapotban (virágzás előtti 4-6. nap) történt. A kontroll növényeket a talaj 100 %-os vízkapacitásának 60 %-ra, a stresszelt növényeket a 25 %-ra öntöztük 2-3 naponta a tömegmérés alapján. A kalászhasban stádium után a növényeket $300 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fényintenzitáson, 12/12 óra fény/sötét megvilágítási periódussal, 25/20 °C nappali/éjszakai hőmérsékleten, 55-60 % relatív páratartalom mellett neveltük. 4 mintavételi, illetve mérési napot tűztünk ki: antéziskor (A), és antézis utáni (days post anthesis, DPA) 4, 9, 12. napokon.

4.2. Relatív növekedés meghatározása

Minden mintavételi napon meghatároztuk 10 csíranövény hajtás- és gyökérhosszát. A relatív növekedési rátát %-ban fejeztük ki, $100 \cdot (L_x - L_o) / L_x$ képlet alapján számítottuk (L_x - az adott mintavételi napon mért hosszúság, L_o - a kezdeti hosszúság). Az eredmények átlagát és a szórást ábrázoltuk (SD).

4.3. Relatív víztartalom (RWC) meghatározása

A relatív víztartalom meghatározáshoz a frissen levett mintának analitikai mérlegen megmértük a friss tömegét (FT). Ezután minimum 3-3 párhuzamos mintát 24 órára desztillált vízbe helyeztünk és meghatároztuk a víztelített tömegét (turgescens tömeg, TT). Majd a mintát 80 °C-on legalább 24 óráig szárítottuk és meghatároztuk a száraz tömegét (SZT). Az RWC értékét a következő képlettel számítottuk ki:

$$\text{Relatív víztartalom (\%)} = \frac{\text{friss tömeg (FT, mg)} - \text{száraz tömeg (SZT, mg)}}{\text{turgescens tömeg (TT, mg)} - \text{száraz tömeg (SZT, mg)}} \cdot 100$$

4.4. A vízpotenciál mérése nyomáskamra módszerrel

A vízpotenciál meghatározását nyomáskamrával végeztük (PMS Instrument Co., Corvallis, USA). A vizsgálati növény levelét úgy helyeztük el a nyomáskamrába, hogy a vágott felszín kiálljon a műszer kamrájára rögzített zárószervezetből. Ezután inert gázt (nitrogént) engedtünk a kamrába, és a gáz nyomását addig növeltük, míg a xilémnedv megjelent a növény kamrából kiálló vágott felületén, ekkor a gáznyomás ellensúlyozza a levél vízpotenciálját. Az ekkor leolvasott nyomás érték megegyezik (ellenkező előjellel) a növény vízpotenciál értékével. Csíranövények esetében vízpotenciál mérésére mindhárom levélen sor került, míg kalászos növényeknél a zászlóslevél alatti levélből történt a vízpotenciál meghatározás 3-5 párhuzamos méréssel.

4.5. Sztómakonduktivitás mérés

A sztómakonduktivitás méréséhez PMR-2 steady state porométert használtunk (PPSystems, Boston, USA). Az 1 s alatt 1 cm^2 -ről elpárologtatott vízmennyiség mértékegysége: mmol/cm^2 . Min. 5-5 növény abaxiális és adaxiális levélfelszínén is megmértük, az adatokat összesítettük és a teljes sztómakonduktancia értéket adtuk meg.

4.6. Pigmenttartalom meghatározás

A pigmenttartalmat a zászlóslevélből határoztuk meg. A levelet hideg, 100%-os acetonban eldörzsöltük (1,5 ml/ 250 mg növényi anyag), centrifugálás (15 perc, 4°C , 5000 g) után a felülúszót félretettük. A csapadékot újra extraháltuk 80%-os acetonnal, 24 óráig (1,5 ml/250 mg növényi anyag). Centrifugálás után (15 perc, 4°C , 5000 g) a két felülúszót összeöntöttük. Az extraktum pigment tartalmát Lichtenthaler és Wellburn (1983) spektrofotometriás módszerével meghatároztuk (abszorbancia értékek meghatározása 470,0 646,8 és 663,2 nm hullámhosszakon, KONTRON Double-Beam spektrofotométeren). A pigment tartalmakat a következő képlettel számoltuk ki:

$$\text{Klorofill a} = 12,25A_{663,2} - 2,79A_{646,8}$$

$$\text{Klorofill b} = 21,50A_{646,8} - 5,10A_{663,2}$$

$$\text{Klorofill a+b} = 7,15A_{663,2} + 18,71A_{646,8}$$

$$\text{Karotinoidok} = (1000 \cdot A_{470} - 1,82 \cdot \text{Kla} - 85,02 \cdot \text{Klb}) / 198$$

Mértékegysége: $\mu\text{g g}^{-1}$ FT.

4.7. A malondialdehid tartalom meghatározása

A malondialdehid (MDA) a lipidek peroxidációjának terméke, mennyiségét tiobarbitursavval való reakciója alapján lehet meghatározni. E szerint a módszer szerint az MDA mellett a stresszhatásra megjelenő reaktív aldehidek is detektálhatóak (Ederli és mtsai. 1997). Az MDA meghatározást zászlósleveleken végeztük. 100 mg mintát homogenizáltunk 1 ml 0.1 % triklórecetsavval (TCA); a további lipidperoxidáció megakadályozására 100 μ l 4 % butilált hidroxitoluolt (BHT) adtunk az extraktumhoz. 20 perces 4 °C-on, 12 000 x rpm-en (15 616 g) történt centrifugálás után a felülúszó 250 μ l-éhez 1 ml 0,5 % tiobarbitursavat adtunk, amelyet 20 % TCA-ban oldottunk fel, majd 30 percig inkubáltuk. Az abszorbanciát 532 nm-nél mértük, amit a 600 nm-nél mért nem-specifikus értékkel korrigáltunk. Az MDA koncentrációt $155 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ extinkciós koefficienssel számoltuk.

4.8. ABS kivonása és meghatározása

A mintákból az ABS kinyerése, kvantifikálása és a visszanyerhetőség ellenőrzése Yang és mtsai (2003) leírása alapján történt.

500 mg levél- vagy gyökér mintát 2,5 ml lúgos extraháló pufferben eldörzsöltük (80% V:V) metanol, mely 1 mg/500 ml butilált hidroxitoluolt tartalmazott antioxidánsként. A mintát lecentrifugáltuk (12 000 x rpm, 15 616 g, 30 perc), a felülúszót eltettük, a csapadékot újabb 2,5 ml pufferben újra extraháltuk (24 óra, +4°C). Centrifugálás után (12000 x rpm, 15 616 g 30 perc) a két felülúszót egyesítettük, és a mintákat vákuumbepárló segítségével bepároltuk. A bepárolt mintákat a pontos tömegük arányában hígítottuk TBS pufferben (Tris pufferelt sóoldat) (25 mM Tris, 100 mM NaCl, 1 mM MgCl_2 hexahidrát, és 3 mM Na-azid, pH 7,5) (100 mg mintához 1500 μ l TBS).

A mérés kalibrálásához tiszta +ABS-ból (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) készített koncentrációsorozatot használtunk.

A minták ABS tartalmának kvantitatív meghatározását kompetitív ELISA módszerrel végeztük, Photodetek ABS kit (Idetek, Sigma Ltd.) segítségével, a gyártó utasításainak megfelelően. A megfelelő szubsztrát hozzáadása után az abszorbancia értékeket 405 nm hullámhosszon, autoreader készülékkel (Dynatech MR 4000) határoztuk meg.

A relatív kötődést Weiler és mtsai (1981) által leírt módon számoltuk.

A kinyerhetőség ellenőrzéséhez 200 pmol +ABS-at (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) adtam 1 g növényi mintához a kivonás előtt. Az ABS kivonásához és kvantifikálásához használt ELISA módszer több, mint 70%-os kinyerhetőséget biztosított. Abszcizinsav tartalmat fiatal növények első, második és harmadik leveléből, valamint a gyökerekből határoztunk meg.

4.9. Aldehid oxidáz aktivitás detektálása

Aldehid oxidáz (AO) aktivitás detektálása poliakrilamid gélelektroforézissel történt. A méréshez 2 ml extraháló elegyben (összetétele: 3 mM EDTA, 10 mM GSH-redukált glutation, 310 μ M FAD, 1 mM DTT-ditiotreitol, 5 mM L-cisztein, 250 mM Tris puffer pH 7,5, fenilmetil szulfonilfluorid, 0,1 mM antipain) eldörzsölt növényi részek centrifugálásával (10 perc 10 000 x rpm, 10 845 g) nyertük ki a sejtnedvet. Majd Bradford szerint történő (1976) fehérjemérés után a hajtásból 400 μ g, a gyökérből 50 μ g fehérjét és tizedmennyiségű brómfenolkék festéket tartalmazó szacharózos mintafelvívó puffer (50 % szacharóz, 0,1 % brómfenolkék) került felvitelre zsebenként a poliakrilamid (5 és 7,5 % szeparáló és stacking) gélre. Szubsztrátként indol-3-aldehidet használtunk (Sagi és mtsai. 1998).

4.10. GST és GPOX aktivitás meghatározása

A mintákat (500 mg) 0,1 M-os pH: 7 foszfát puffer és 1 mM fenilmetilszulfonil-fluorid (PMSF) elegyében dörzsöltük el 1 % polivinil-polipirrodilon (PVPP) jelenlétében, jégen. A gézen átszűrt homogenizátumot 4 °C-on 20 percig centrifugáltuk (12000 x rpm, 15 616 g). A továbbiakban a felülúszót használtuk enzim aktivitás mérésére.

A glutation transzferáz aktivitást (EC 2.5.1.18) Habig és mtsai. (1974) által kidolgozott módszerrel határoztuk meg, 1-klór-2,4-dinitrobenzol (CDNB) szubsztráttal. A reakcióelegy végtérfogata 1 ml volt, 0,1 M-os foszfátpufferhez (pH 6,5) mértünk 3 μ M redukált glutationt (GSH) és a reakciót 1 μ M CDNB hozzáadásával indítottuk el. A 340 nm-en mért extinkció változásból a 2. és 3. perc közötti értékek felhasználásával számoltunk. $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, Egy enzim egység (U) = az egy perc alatt keletkezett konjugált termék mennyisége μ mól-ban megadva. Az enzim működését specifikus aktivitás egységben fejeztük ki (U/g FT).

A glutation peroxidáz (EC. 1.11.1.9) aktivitást Awasthi és munkatársai (1975) által kidolgozott módszer alapján végeztük, kumén hidroperoxid (CHP) szubsztráttal (Csiszár és

mtsai. 2004). A kimutatás a szerves hidroperoxidok átalakítása közben felhasznált GSSG visszaredukálásához szükséges NADPH mennyiségének mérésével történik. A reakcióelegy 1 ml végtérfogatban tartalmazott 0,1 M foszfát pufferben (pH: 7,0) 0,2 mM NADPH-t, 4 mM GSH-t, 0,05 unit búza extraktumból tisztított GR enzimet, 200 μ l enzimkivonatot és 0,1 mM CHP-t. A reakciót CHP hozzáadásával indítottuk, 1 perc után mértük az extinkciót 340 nm-en GSH-t és NADPH-t nem tartalmazó mintával szemben 2 percig. A nem -specifikus NADPH oxidáció figyelembe vételéhez az extinkció különbséget meghatároztuk CHP nélkül is. $\epsilon_{340} = 6,22 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$, az egy perc alatt fogyott NADPH-t μ mólban megadva fejeztük ki az enzimegységet (U), az enzim működését 1 g friss tömegre vonatkoztattuk (U/g FT).

4.11. GSTszekvencia keresés és filogenetikai analízis

A búza GST szekvenciákat *in silico* azonosítottuk. Elsőként búza géneket kerestünk (700bp fölötti mRNS szekvenciák) a DDBJ/EMBL/GenBank adatbázisokban. Majd ezek felhasználásával homológia keresést végeztünk (-20 volt a homológia várható valószínűsége – E érték) a búza tentatív konszenzus szekvenciái (TC) között. A TC-k között szelektálást végeztünk, amely során a duplán szereplő szekvenciáktól (95% feletti egyezésnél csak az egyik szekvenciával dolgoztunk tovább) és a bizonytalanul összeillesztett TC-ket kihagytuk a további vizsgálatból. A többi feltehetően különböző GST fehérjét kódoló szekvenciákból homológia illesztést hoztunk létre (EMBL-EBI/ClustalW), majd fehérje szekvenciává lefordítottuk BioEdit program segítségével, amely középső részén egy 300 aminosavból álló nagymértékben homológ régiót vágunk ki (a kiindulási fehérje szekvenciák 400-500 aminosavból álltak) és ezen régió felhasználásával rokonsági fát hoztunk létre.

4.12. RNS izolálás, cDNS átírás

Az össz növényi RNS preparálást Chomczynski és Sacchi (1987) szerint végeztük. 100 mg kiindulási anyagot dörzscsészében folyékony nitrogén és kvarchomok felhasználásával homogenizáltuk és hideg állapotban, ribonukleáz mentes környezet biztosításával, 1 ml feltáró pufferbe helyeztük. A feltáró puffer guanidium izotiocianátot (1,822 M), nátrium-citrátot (11,36 mM), kálium-acetátot (200 mM, pH 4.0), N-lauril-szarkozint (0,7341 mM), β -merkaptotetanolt (44 mM), vízzel telített fenolt (45,45 %) tartalmazott. Az elegyet 65 °C-on 3 percig inkubáltuk, ezt követően legalább három percig szobahőmérsékleten állni hagytuk. Majd

5:1 (V:V) kloroform hozzáadása után 4 °C-ra előhűtött centrifugában 15 percig centrifugáltuk (10 000 x rpm, 10 845 g). A minták felülúszó részét átpipettáztuk egy-egy 750 µl kloroform: izopropil-alkoholt (24:1) tartalmazó Eppendorf csőbe. Újabb centrifugálás (15 perc 10 000 x rpm, 10 845 g) után a minták felülúszó részéhez egy újabb Eppendorf csőben 500 µl izopropanolt adtunk. Majd szobahőmérsékleten inkubáltuk legfeljebb 10 percig. Centrifugálás után, és az RNS csapadékot 70 %-os etanollal mostuk. A mosást követően 25 µl dietil-pirokarbonát (DEP) kezelt steril desztillált vízben feloldottuk az összRNS-t. Az RNS mennyiségét a 260 nm-en mért optikai denzitás meghatározásával, spektrofotométeren ellenőriztük (U-3310 Spectrophotometer, Hitachi, Tokio, Japán). A minták tisztaságára és minőségére az OD260/OD280 és az OD 260/230 arányból következtettünk, illetve elektroforézissel (1%-os agaróz gélben) ellenőriztük az esetleges degradációt.

Az RNS minták genomi DNS szennyezettségétől való megtisztításához DNáz kezelést végeztünk. 12 µl RNS minta DNáz emésztését 40 µl végtérfogatban 4 µl 10x-es puffer és 4 U DNáz enzim (Fermentas) illetve 100 U Ribonukleáz inhibitor hozzáadásával oldottuk meg. Az elegyet 37 °C-on 30 percig inkubáltuk, majd 65 °C-on inaktívtuk a Fermentas cég használati útmutatója szerint. Az elegyből a fehérjéket 150-150 µl fenol, kloroform hozzáadásával elimináltuk, 15 perc 10 000 x rpm (10 845 g) centrifugálást követően egy újabb kloroformos tisztítási lépés után (1:1, v:v) a genomi DNS szennyeződéstől megtisztított össz RNS-t 109,09 mM-os Na-acetát és 96% etanol elegyével precipitáltuk. Az így nyert RNS csapadékot 20 µl steril, DEP-kezelt desztillált vízbe visszaoldottuk, majd tisztaságát és mennyiségét a fent ismertetett módon ellenőriztük.

A tisztított RNS mintából összesen 1 µg-ot reverz transzkripcióval cDNS-sé alakítottunk random hexamer primerek (Biotium) segítségével. A reakciót 20 µl végtérfogatban végeztük, a gyártó (Fermentas, Burlington, Canada) utasításait követve. Első lépésben 5 percig 70 °C-ra hevítettük a templátot (2 µg), és a random hexamert (50 ng), majd 4 µl tömény reakciópuffer, 10 mM 4 dNTP mix (1 mM végkoncentráció) és 20 U ribonukleáz inhibitor hozzáadása után az elegyet 25 °C-on, 5 percig inkubáltuk. Ezután a reakcióhoz 200 unit reverz transzkriptáz enzimet adtunk, mellyel egy óráig inkubáltuk az elegyet 37 °C-on. A reakciót 10 perces 70 °C-os hevítéssel állítottuk le, amit ribonukleáz kezelés követett: 50 U ribonukleáz A hozzáadásával 37 °C-on 20 percig.

Az így kapott cDNS-t kvantitatív Real-Time PCR (valós idejű polimeráz láncreakció) reakciókhoz alkalmaztuk.

4.13. QRT-PCR (kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció)

A vizsgált gének kifejeződését kvalitatív RT-PCR technikával követtük nyomon. A kiválasztott génre az oligonukleotidokat részben az Applied Biosystems Primer Express szoftverrel, részben pedig a Primer 3 szoftver (<http://frodo.wi.mit.edu/>) segítségével terveztük, a primereket táblázatban foglaltuk össze (4.1. táblázat). A szintetizált cDNS-eket 1: 28 arányban hígítottuk nukleáz mentes vízzel. A reakcióelegy 20 µl végtérfogat volt, amiben az egyes oligonukleotidokat 150 µM végkoncentrációban voltak jelen, valamint 9 µl a hígított cDNS-ből és 10 µl a 2x SYBR Green PCR Master Mixből (Applied Biosystems, Foster City, California). Minden reakció esetében legalább három párhuzamos mérést végeztünk. A kvantitatív PCR-t MJ research PCR készülékkel és BioRad (Hercules, California) Real-Time PCR Detektorral végeztük. A reakció 10 perces 90 °C-os hevítéssel kezdődött, majd 41 ciklus következett az alábbi paraméterekkel: 95 °C-on 15 másodperc és 60 °C-on 1 perc. A SYBRGreen festék fluoreszcencia intenzitását a ciklusok során minden amplifikációs lépés után detektáltuk Opticon Monitor szoftver segítségével (BioRad, Hercules, California). A PCR lefutását követően a termék specifikusságát olvadási görbe detektálásával ellenőriztük: 55 °C-tól 90 °C-ig (0,2 °C 0,2 s⁻¹). Az adatok analíziséhez a 2^{-ΔΔCt} módszert alkalmaztuk (Livak és Schmittegen, 2001). Az első tájékozódó PCR után a GK Élet kiindulási kontroll mintáinak transzkript szintje volt a legalacsonyabb a kalászos növényeken elvégzett kísérletben. A fajtakör bővülésével mértünk alacsonyabb értékeket, de az eredmények konzisztenciájának megtartása érdekében GK Élet fajta kiindulási kontroll értékei a transzkript szint relatív egységei kalászos növényekben. Ez az egység csíranövények esetében Cappelle Desprez fajta kiindulási kontroll mintáinak transzkript szintje. A referenciagének fiatal búza esetében a 18S rRNS, tubulin és elongációs faktor 1 α alegysége (EF 1) voltak (4.1. táblázat), míg zászlóslevélből történt mérésekhez a referencia gének EF 1 és egy ismeretlen funkcióval rendelkező fehérjét kódoló gén (NP 1) voltak, amelyek konstitutív expressziót mutattak búza zászlóslevélben szemfeltöltődés alatt (Jukanti és mtsai. 2006).

Azonosítási szám	Jellemzés	Szekvencia (5'-3')
NP_1 (AK335868) F	Gene with unknown function	ccaagacgaagcagaacaga
NP_1 (AK335868) R		acacatccaacgcaagagaa
EF_1 (AK334915) F	Elongációs faktor 1 α alegység	aacttcacctcccaggtcat
EF_1 (AK334915) R		gtcaccagctcagcaaactt
AY049040 F	18S riboszómális RNS	gtgacgggtgacggagaatt
AY049040 R		gacactaatgcgcccggtat
AJ441055 F	GSTF6	caagaagccgtgatttgcta
AJ441055 R		gcgacaccaacaagaaaaga
AY064481 F	GST19E50	agcagcaaccaagggaataat
AY064481 R		cgccacgttcgtcgacatg
X56004 F	GSTA2	ttcagtgcatcatcattcc
X56004 R		ccttcaccttgggtactca
AJ414698 F	GSTU1B	cggagggaaggaacaaataa
AJ414698 R		cactgactgacccaaccaac
AJ414699 F	GSTU1C	ggtagttgtttggtttgtagtgtga
AJ414699 R		gcaggtggcaacacttgaca
AJ414700 F	GSTU2	ccgtgctcgcttggat
AJ414700 R		ggcctgagtctgtgtttgt
AF002211 F	GSTZ	atgagagccttgaggtggt
AF002211 R		cacacatctcccaatggac

4.1. táblázat: A kvantitatív RT-PCR-hez felhasznált oligonukleotidok

4.14. Statisztikai kiértékelés

A kísérleteket minimum két biológiai ismétlésben végeztük el, legalább 3-3 (relatív növekedés esetében 10) párhuzamos méréssel. A dolgozatban bemutatott adatok egy reprezentatív kísérlet adataiból számított átlag értékek a hozzá tartozó szórással (standard deviancia, \pm SD). Amennyiben az SD értékek kisebbek, mint az adatot jelző jelölés, az ábrákon nincsenek feltüntetve.

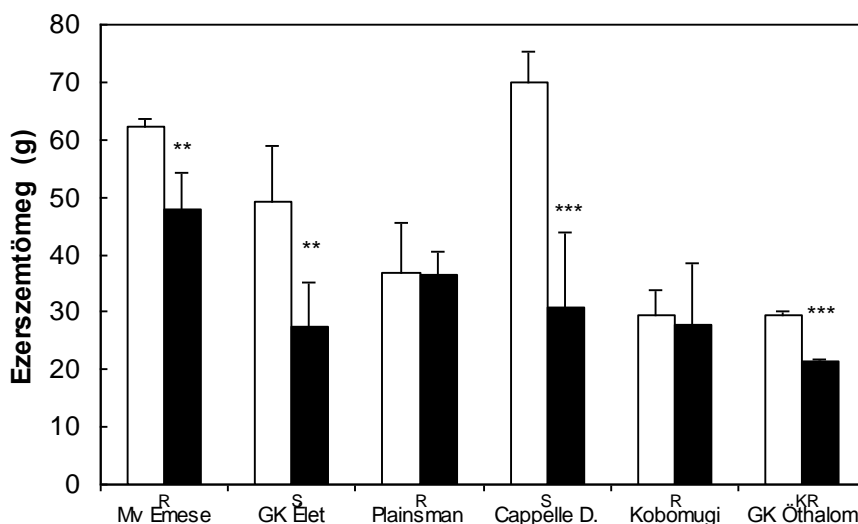
A vizsgálati eredmények matematikai-statisztikai feldolgozását és kiértékelését a SigmaStat 3.1 (Systat Software Inc, USA) szoftverrel végeztük. A kontrolltól való szignifikáns különbségeket Student-féle *t*-teszttel állapítottuk meg $P \leq 0.05$ (*), 0.01 (**) vagy 0.001 (***) valószínűségi szinteken. Más esetben ugyanezen program segítségével a varianciaanalízist követően a Duncan-féle tesztet alkalmaztuk $P \leq 0.05$ tekintve szignifikánsnak. Duncan teszt alkalmazásakor a különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten.

5. Eredmények

5.1. Szárazságstressz hatása kalászoló búza növények hozamára és zászlós leveleinek öregedési folyamatára, fiziológiai paramétereire és GST expressziójára

5.1.1. Ezerszemtömeg

A vízhiány hatására bekövetkező termésnövekedés a szárazságtűrés legfontosabb, komplex agronómiai mutatója. Előzetes ismereteink szerint az Mv Emese, Plainsman és Kobomugi fajták termésstabilitás alapján a szárazságra rezisztensnek minősültek, míg a GK Öthalom közepes szárazságtűrő, a GK Élet és a Cappelle Desprez pedig érzékenyek a szárazságra. Karpensein-Machan és Maschka (1996) gabonafajokkal végzett széles körű elemzések alapján megállapította, hogy búzáknál az ezerszemtömeg a meghatározó termésem. Ennek a paraméternek az értéke nagymértékben függ a szemfeltöltődés folyamatától. Megmértük az ezerszem tömeget a hat vizsgált fajta (Mv Emese, GK Élet, Plainsman, Cappelle Desprez, Kobomugi és GK Öthalom) esetében jól öntözött és szárazságnak kitett növényeknél (5.1. ábra). Kísérletünkben a kalászhasban állapottól történő öntözésmegvonás az Mv Emese, GK Élet, Cappelle Desprez és GK Öthalom esetében szignifikáns csökkenést okozott, míg az ezerszemtömeg nem változott a Plainsman és a Kobomugi fajták esetében.



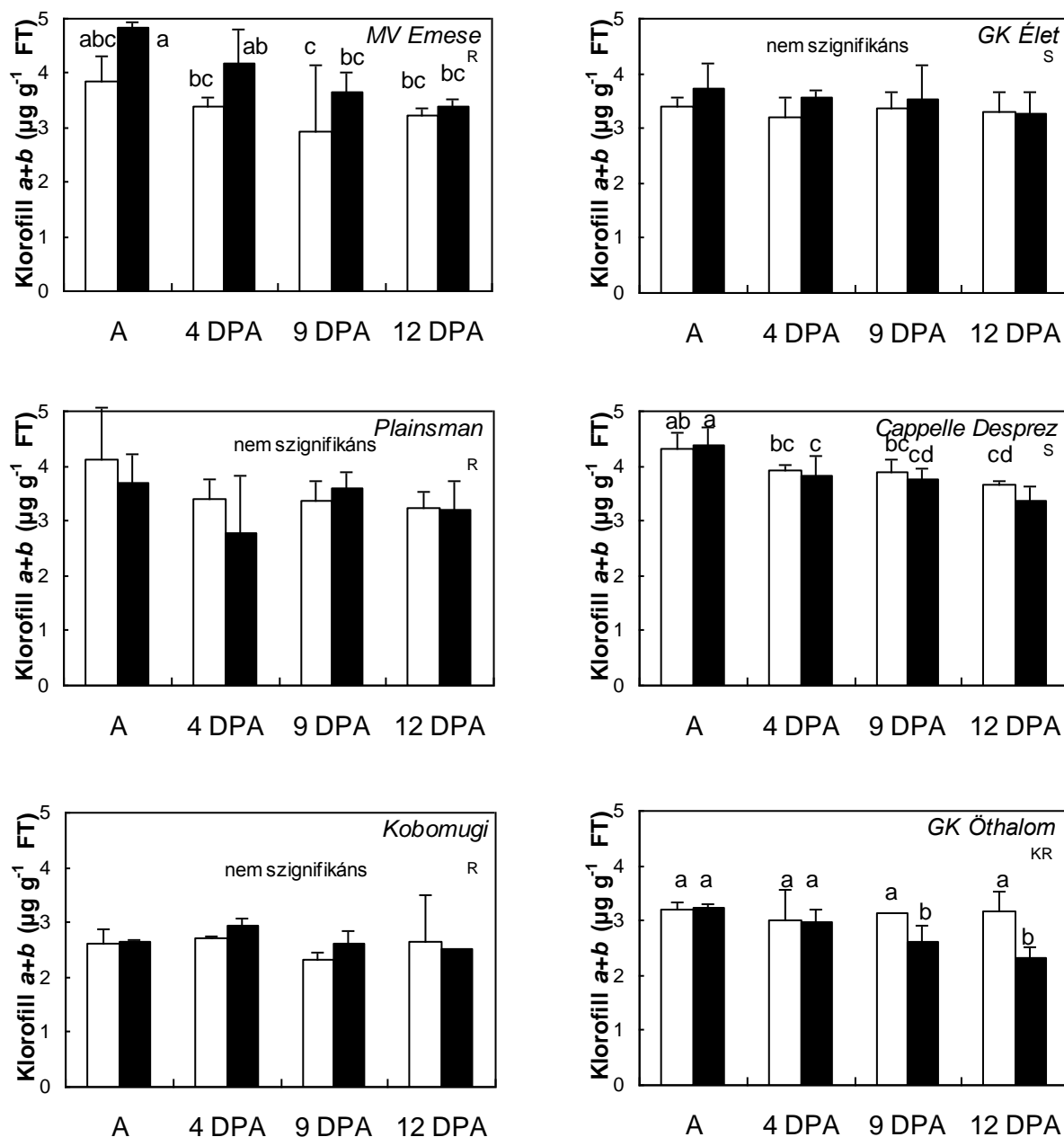
5.1. ábra: Ezerszemtömeg kontroll és szárazságnak kitett Mv Emese, GK Élet, Plainsman, Cappelle Desprez, GK Öthalom és Kobomugi búzafajták esetében. (□ öntözött, ■ szárazságstressznek kitett mintákat, az R, KR, S betűk a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli). A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).

5.1.2. Klorofill $a+b$, karotinoid és MDA tartalom

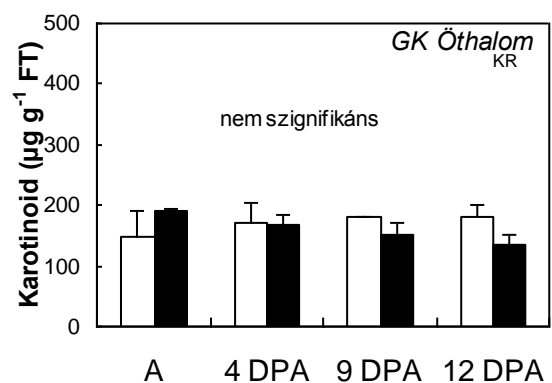
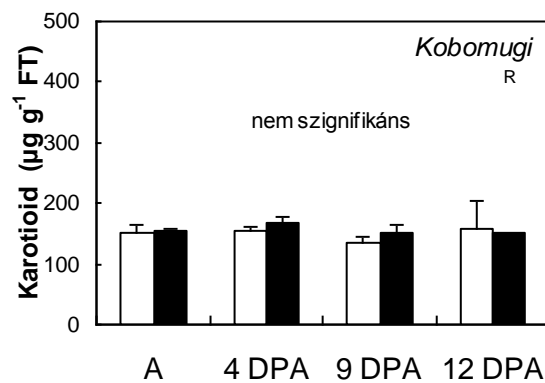
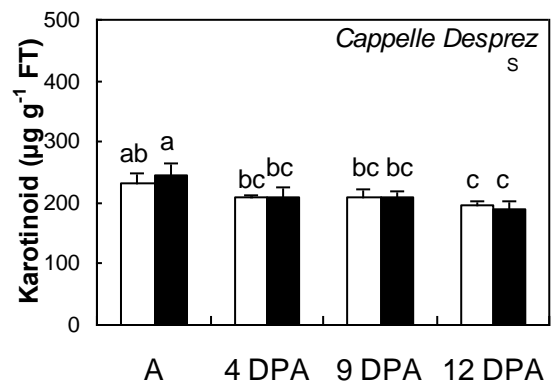
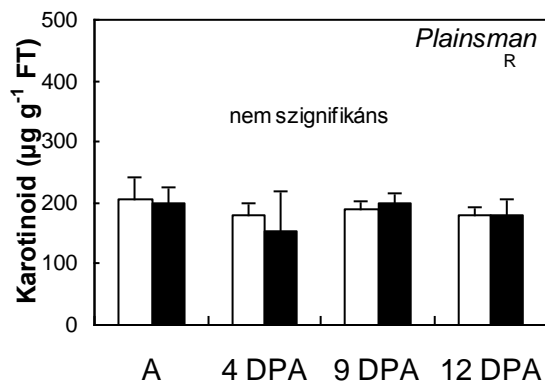
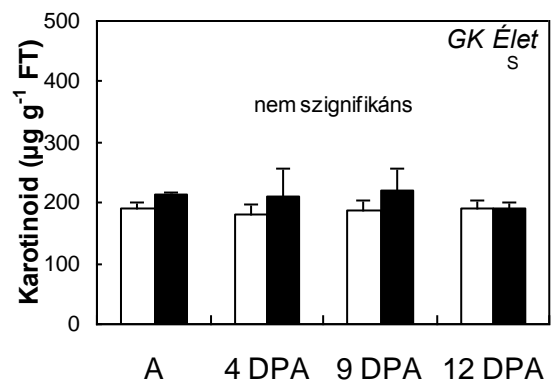
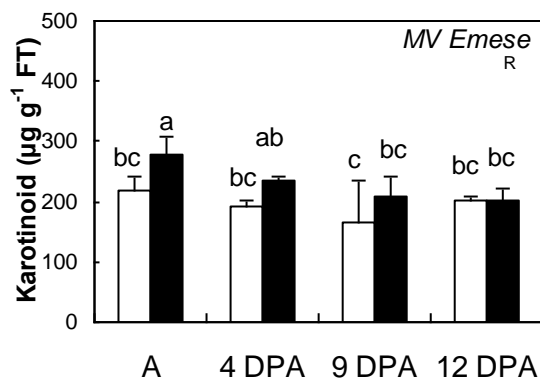
A szemfeltöltődés meghatározó paramétere a zászlóslevél szeneszenciájának időzítése. Ennek a folyamatnak a vizsgálatára alkalmasak az ún. szeneszencia paraméterek, pl. a hajtás klorofill $a+b$ (5.2. ábra), karotinoid (5.3. ábra) és a malondialdehid (MDA) tartalom (5.4. ábra). Minden fajta esetében elmondható, hogy a szeneszencia jelei a 12 DPA-ra (days post anthesis - antézis után eltelt napok) megmutatkoztak a paraméterek valamelyikében. Az MV Emesénél mind a kontroll, mind a szárazságnak kitett mintában csökkent a klorofill $a+b$ és a karotinoid tartalom a 12 DPA-ra. A szárazságra érzékeny GK Élet esetében a pigment tartalmakban nem történt szignifikáns változás a vizsgált periódusban. Nem volt szignifikáns csökkenés a klorofill $a+b$ és a karotinoid tartalomban a Plainsman fajtában. A Cappelle Desprez fajtánál szintén csökkentek az öntözött és a szárazságnak kitett növények zászlósleveleinek pigment tartalom értékei a vizsgált időszakban, és a csökkenések szignifikánsak voltak. Kobomugi esetében sem a szárazság, sem az öregedés hatására nem volt szignifikáns változás detektálható a paraméterekben. GK Öthalom esetében az öntözésmegvonás hatására az utolsó mintavételi napokra lecsökkent a pigment tartalom.

Az Mv Emese és Plainsman fajtánál az MDA tartalom a kontroll és a stressznek kitett mintákban egyaránt lépcsőzetesen emelkedett az utolsó mintavételi napig (5.4. ábra). A Cappelle Desprez és GK Élet fajtákban kisebb változások voltak megfigyelhetőek, a GK Élet esetében a szárazságstressz az utolsó napon okozott szignifikáns növekedést. A Cappelle Desprez fajta zászlóslevelének MDA tartalma kismértékű emelkedést mutatott a kísérlet három mintavételi napján a kontrollhoz képest. Kobomugi fajtában jelentős emelkedés az utolsó mintavételi napon volt megfigyelhető az öntözött és a száraz minták között, míg GK Öthalom zászlósleveleinek malondialdehid tartalma a szárazságnak kitett mintákban minden mintavételi napon szignifikáns emelkedést mutatott.

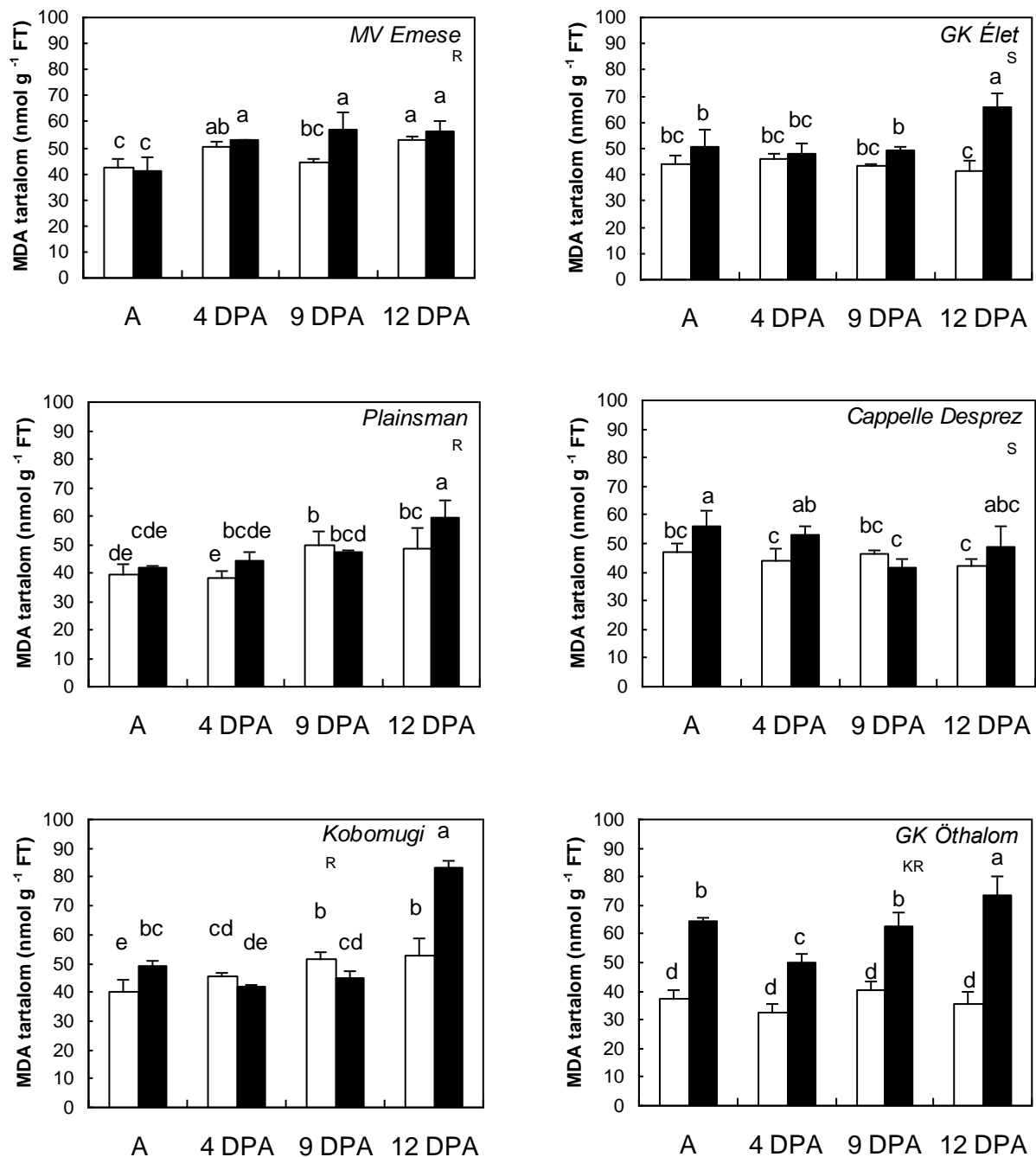
A szeneszencia paraméterek alapján két szárazságra rezisztens fajtánál, az Mv Emese és Plainsman esetében fokozatosan manifesztálódott a zászlóslevél öregedési folyamata, míg a GK Élet és Kobomugi fajtáknál csak a malondialdehid tartalom változott az utolsó mintavételi napra a vízhiányos mintákban.



5.2. ábra: Kontroll és szárazságnak kitett Mv Emese, GK Élet, Plainsman, Cappelle Desprez, Kobomugi és GK Öthalom búzafajták zászlós levelének klorofill *a+b* tartalma (□ öntözött, ■ szárazságstressznek kitett mintákat, az R, KR, S betűk a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli). Az x tengelyen az antézis után eltelt napok száma (DPA) szerepel. A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit Duncan teszt segítségével határoztunk meg.



5.3. ábra: Kontroll és szárazságnak kitett Mv Emese, GK Élet, Plainsman, Cappelle Desprez, Kobomugi és GK Öthalom búzafajták zászlós levelének karotinoid tartalma (□ öntözött, ■ szárazságstressznek kitett mintákat, az R, KR, S betűk a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli). Az x tengelyen az antézis után eltelt napok száma (DPA) szerepel. A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit Duncan teszt segítségével határoztunk meg.



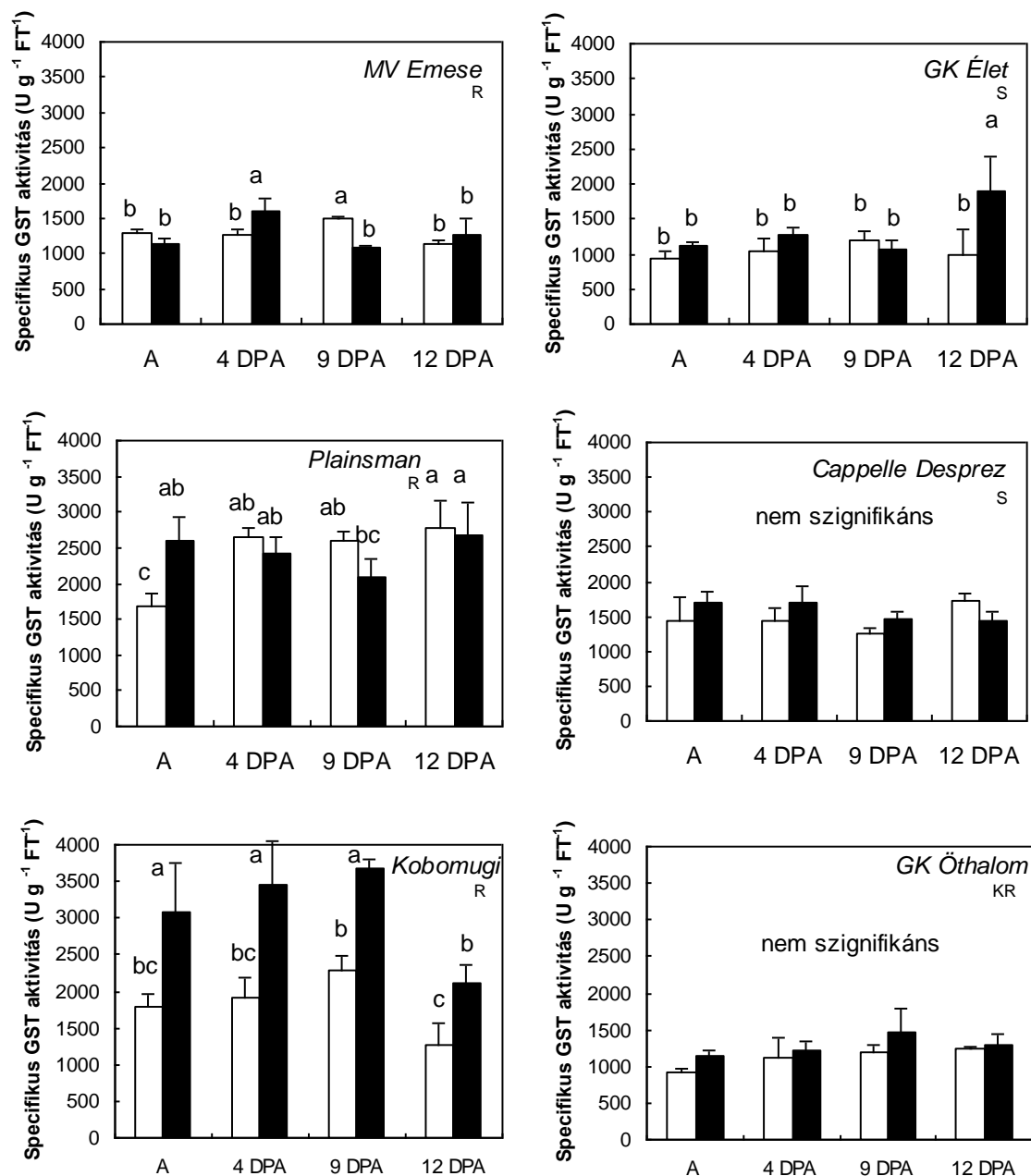
5.4. ábra: Kontroll és szárazságnak kitett Mv Emese, GK Élet, Plainsman, Cappelle Desprez, Kobomugi és GK Öthalom búzafajták malondialdehid (MDA) tartalma. (□ öntözött, ■ szárazságstressznek kitett mintákat, az R, KR, S betűk a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli). Az x tengelyen az antézis után eltelt napok száma (DPA) szerepel. A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

5.1.3. GST és GPOX aktivitás a zászlóslevélen

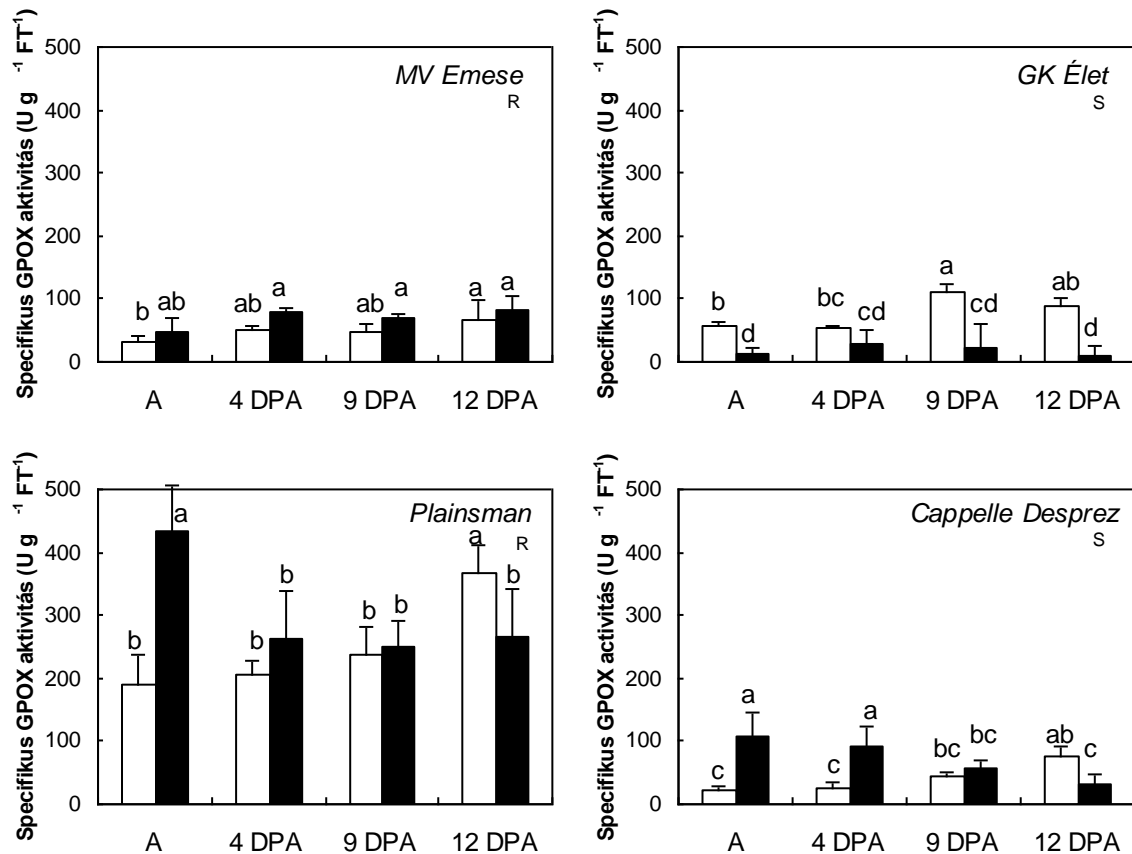
Szárazságstressz hatására a növényi sejtekben toxikus metabolitok széles skálája jelenik meg. Ezek eltávolításáért felelős a méregtelenítési folyamatok egyik kulcsenzime, a GST, elsősorban glutation transzferáz és glutation peroxidáz aktivitása révén. A legmagasabb extrahálható GST aktivitást és stressz hatására a legmarkánsabb indukciókat a szárazságtűrő Plainsman és Kobomugi fajtáknál lehetett detektálni a zászlóslevélben (5.5. ábra). A Plainsman esetében az antézis napján (az öntözés szétválasztása után kb. 6 nappal) szignifikáns különbség volt mérhető a kontroll és stresszelt minták között, de a további mintavételi napokon nem volt szignifikáns különbség, mert az antézis után a kontroll levelek GST aktivitása is nőtt. A Kobomugi esetében minden mintavételi napon szignifikánsan megemelkedett a GST aktivitás a vízmegvonás hatására. Mv Emese zászlóslevél GST aktivitása stressz hatására az antézis utáni 4. napon indukálódik szignifikánsan. A Cappelle Desprez és GK Öthalom esetében a szárazságstressz nem okozott jelentős GST aktivitás emelkedést. A GK Élet esetében - az MDA tartalomhoz hasonlóan - az utolsó mintavételi napon volt indukció megfigyelhető.

A GPOX enzimaktivitás méréseket négy búzafajtán végeztük el (Mv Emese, GK Élet, Plainsman, Cappelle Desprez). Az extrahálható GPOX aktivitásban mind a négy fajtán szignifikáns növekedést mértünk kontroll körülmények között a zászlóslevelekben. Az Mv Emese, Plainsman és Cappelle Desprez fajták esetében szárazságstressz hatására növekedést tapasztaltunk az antézis napján. A szenzitív GK Élet fajta GPOX aktivitása stressz hatására szignifikánsan csökkent (5.6. ábra).

A GSTk szerepének részletes tanulmányozásához egyes szekvenciák expressziójának alakulását is vizsgáltuk.



5.5. ábra: Kontroll és szárazságnak kitett Mv Emese, GK Élet, Plainsman, Cappelle Desprez, Kobomugi és GK Öthalom búzafajták zászlós levelének specifikus GST aktivitása (□öntözött, ■szárazságstressznek kitett mintákat, az R, KR, S betűk a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli). A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit Duncan teszt segítségével határoztunk meg.



5.6. ábra: Kontroll és szárazságnak kitett Mv Emese, GK Élet, Plainsman és Cappelle Desprez búzafajták zászlós levelének specifikus GPOX aktivitása (□ öntözött, ■ szárazságstressznek kitett mintákat, az R, KR, S betűk a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli). A különböző betűvel jelölt oszlopok szignifikánsan különböznek egymástól $P \leq 0,05$ valószínűségi szinten, amit Duncan teszt segítségével határoztunk meg.

5.1.4. GST kódoló szekvenciák összehasonlítása és filogenetikai vizsgálata

A GenBank/DDBJ/EMBL adatbázisokban 24 búza GST gén szerepel (5.1. táblázat). Közülük 18-at kiválasztottunk (mRNS kódoló, 700 bp-nál nagyobb szekvenciákat) és a velük nagyfokú szekvencia homológiát mutató tentatív konszenzus szekvenciákból rokonsági fát hoztunk létre (5.7 ábra). Az irodalomból ismert konzervatív, csoport specifikus fehérje és nukleinsav szekvenciák felhasználásával sikerült a GST csoportokat beazonosítani a rokonsági fán. Nagy variabilitást mutat a két legnagyobb GST csoport, a phi (*GSTF*) és a tau (*GSTU*), melyek 38 és 26 szekvenciát tartalmaznak. A zéta (*GSTZ*), théta (*GSTT*), lambda (*GSTL*), és DHAR (*GSTDHAR*) csoportok pontosan 8, 11, 7 és 8 tagúak (5.7 ábra).

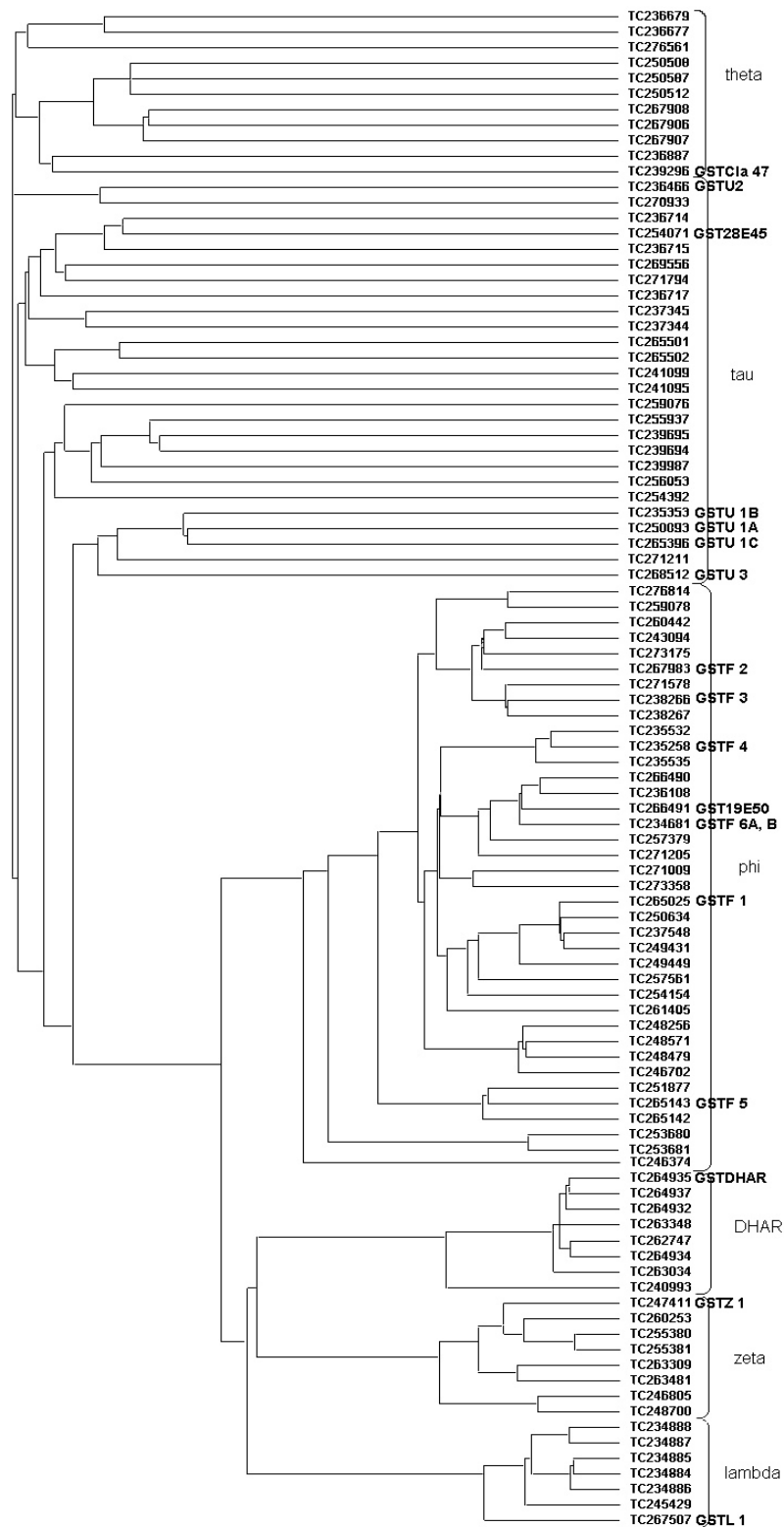
A GST expressziójának vizsgálatára zászlóslevélben a szemfeltöltődés során 6 gént választottunk ki, elsősorban irodalmi adatok alapján. Kunieda és mtsai. (2005) árpa zászlós

levelében azonosítottak szeneszencia indukált GSTt (SIGST), amely gén nagymértékben konzervatív régiókat tartalmaz, és amely régiók nagy hasonlóságot mutattak a **TaGSTU1** három alléljával található régiókkal. Thom és mtsai. 2002-ben közöltek egy tanulmányt a búzában található tau csoportú GSTk fehérjék kinetikai paramétereiről és szubsztrát specifitásukról. Többek között az oxidatív stressz metabolitokkal szembeni aktivitásukat vizsgálták egy analóg, a krotonaldehid felhasználásával és kimutatták, hogy a **TaGSTU1** gén mutatta a legmagasabb aktivitást.

Egy előzetes kísérletben Szegedi Biológiai Központ Növénybiológiai Intézetében Dr Györgyey János és csoportja makroarray kísérletet végzett azzal a céllal, hogy a szárazság akklimatizációban szerepet játszó géneket keressenek (Secenji és mtsai. 2010b). Szárazság, illetve ozmotikus stressz hatását vizsgálták Plainsman és Kobomugi búzafajtákra, és a kísérletben bizonyos GST gének (**TaGSTU1B**, **TaGSTU1C**, **TaGST19E50** és **TaGSTZ**) is indukálódtak. A **TaGSTU1B**, **TaGSTU1C** a tau csoportba, a **TaGSTZ** a zéta csoportba, a **TaGST19E50** pedig a phi csoportba tartozik. A vizsgálatainkhoz két phi csoportú szekvenciát választottunk: az előzőeken megemlített **TaGST19E50** mellett a **TaGSTF6** gént. A TaGSTF6 szubsztrát specifitását Cummins és mtsai. (2003) határozták meg, amely magas konjugatív aktivitást mutatott oxidatív stressz metabolit analógokkal szemben. Az expressziós vizsgálatokba bevontuk a **TaGSTZ** gént és a **TaGSTA2**-t, amely nagy szekvencia hasonlóságot mutatott egy patogén indukált GST génhez (Dudler és mtsai. 1991).

Azonosítási szám	hossz (bp)	Csoport	Név	Molekula típus	Publikálva:
X56012	2178	phi	<i>TaGSTA1</i>	genomic DNA	Dudler és mtsai. 1991
X56004	3196	phi	<i>TaGSTA2</i>	genomic DNA	Mauch és mtsai. 1991
AF387085	911	phi	-	mRNA	Zhu and Ma unpublished
AF184059	914	phi	-	mRNA	Goetzberger és mtsai. 2000
AY064481	965	phi	<i>19e50</i>	mRNA	Theodoulou és mtsai. 2003
AJ441055	904	phi	<i>TaGSTF6b</i>	mRNA	Cummins és mtsai. 2003
AJ440796	927	phi	<i>TaGSTF1</i>	mRNA	Cummins és mtsai. 2003
AJ440795	897	phi	<i>TaGSTF6</i>	mRNA	Cummins és mtsai. 2003
AJ440794	866	phi	<i>TaGSTF5</i>	mRNA	Cummins és mtsai. 2003
AJ440793	721	phi	<i>TaGSTF4</i>	mRNA	Cummins és mtsai. 2003
AJ440792	930	phi	<i>TaGSTF3</i>	mRNA	Cummins és mtsai. 2003
AJ440791	865	phi	<i>TaGSTF2</i>	mRNA	Cummins és mtsai. 2003
AJ414701	1043	tau	<i>TaGSTU3</i>	mRNA	Thom és mtsai. 2002
AJ414700	926	tau	<i>TaGSTU2</i>	mRNA	Thom és mtsai. 2002
AJ414699	1008	tau	<i>TaGSTU1C</i>	mRNA	Thom és mtsai. 2002
AJ414698	1051	tau	<i>TaGSTU1B</i>	mRNA	Thom és mtsai. 2002
AJ414697	1085	tau	<i>TaGSTU1A</i>	mRNA	Thom és mtsai. 2002
AF479764	1018	tau	<i>TaGSTU4 (28e45)</i>	mRNA	Theodoulou és mtsai. 2003
AF002211	945	zeta	<i>TaGSTZ1</i>	mRNA	Subramaniam és mtsai. 1999
AF109714	2947	zeta	-	genomic DNA	Subramaniam és mtsai. 2000
AY377972	384	zeta	-	genomic DNA	Ghaffari unpublished
AY064480	901	theta	<i>Cla47</i>	mRNA	Theodoulou és mtsai. 2003
Y17386	1031	lambda	<i>TaGSTII</i>	mRNA	Theodoulou és mtsai. 2003
AY074784	956	dhar	<i>TaGSTDHAR</i>	mRNA	Chen és mtsai. 2003

5.1. táblázat: A GenBank/DDBJ/EMBL adatbázisokban szereplő búza GST gének.



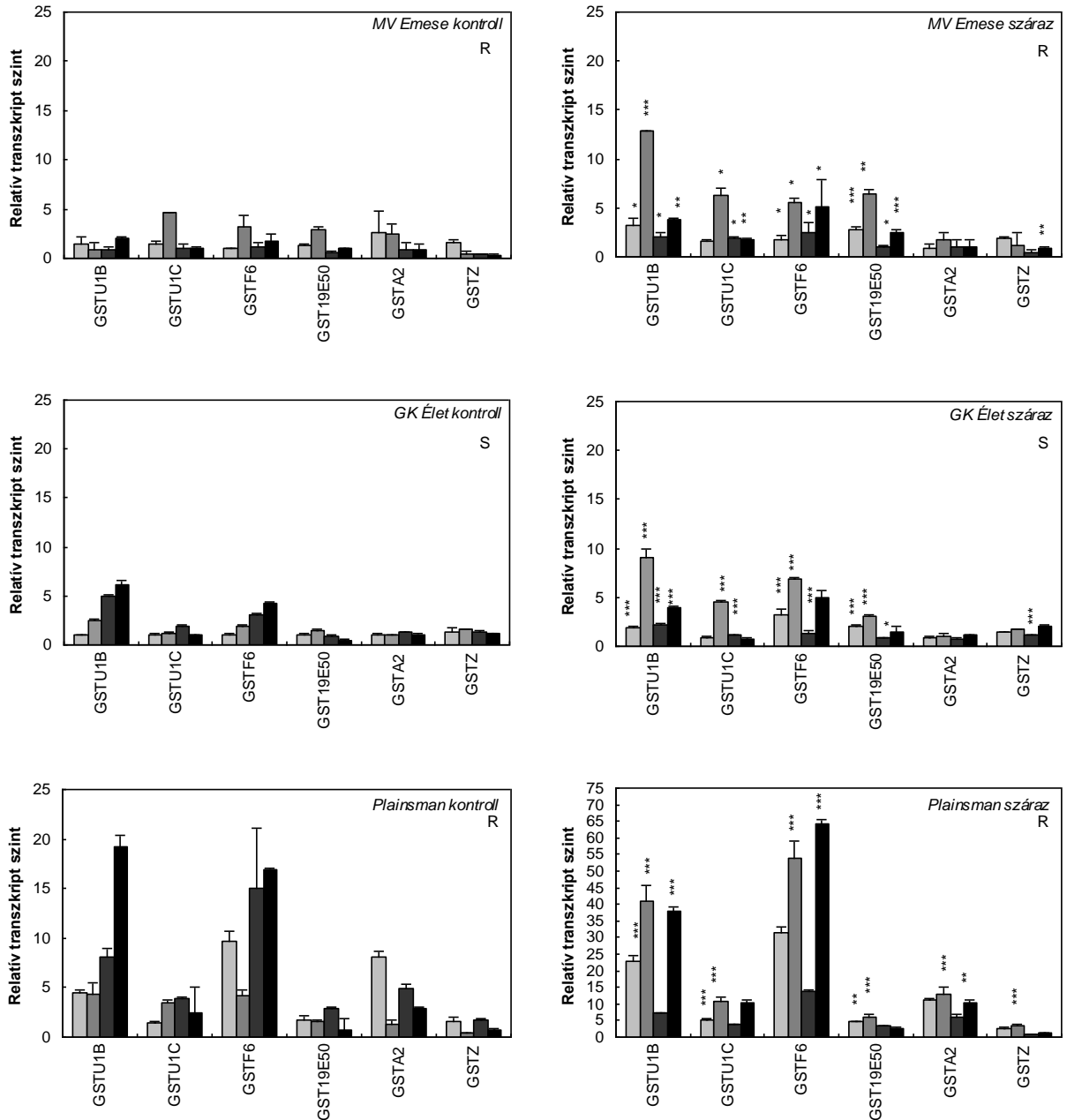
5.7. ábra: Rokonsági fa (filogram) a búza ismert GST szekvenciáiból. A rokonsági fán a tentatív konszenzus szekvenciák azonosítási számai láthatóak. Amennyiben a TC egy ismert gén szekvenciáját tartalmazta, a gén nevét feltüntettük a TCk mellett, illetve a GST csoportokat is jelöltük.

5.1.5. *GST* génexpresszió tanulmányozása a szárazságstressz alatt

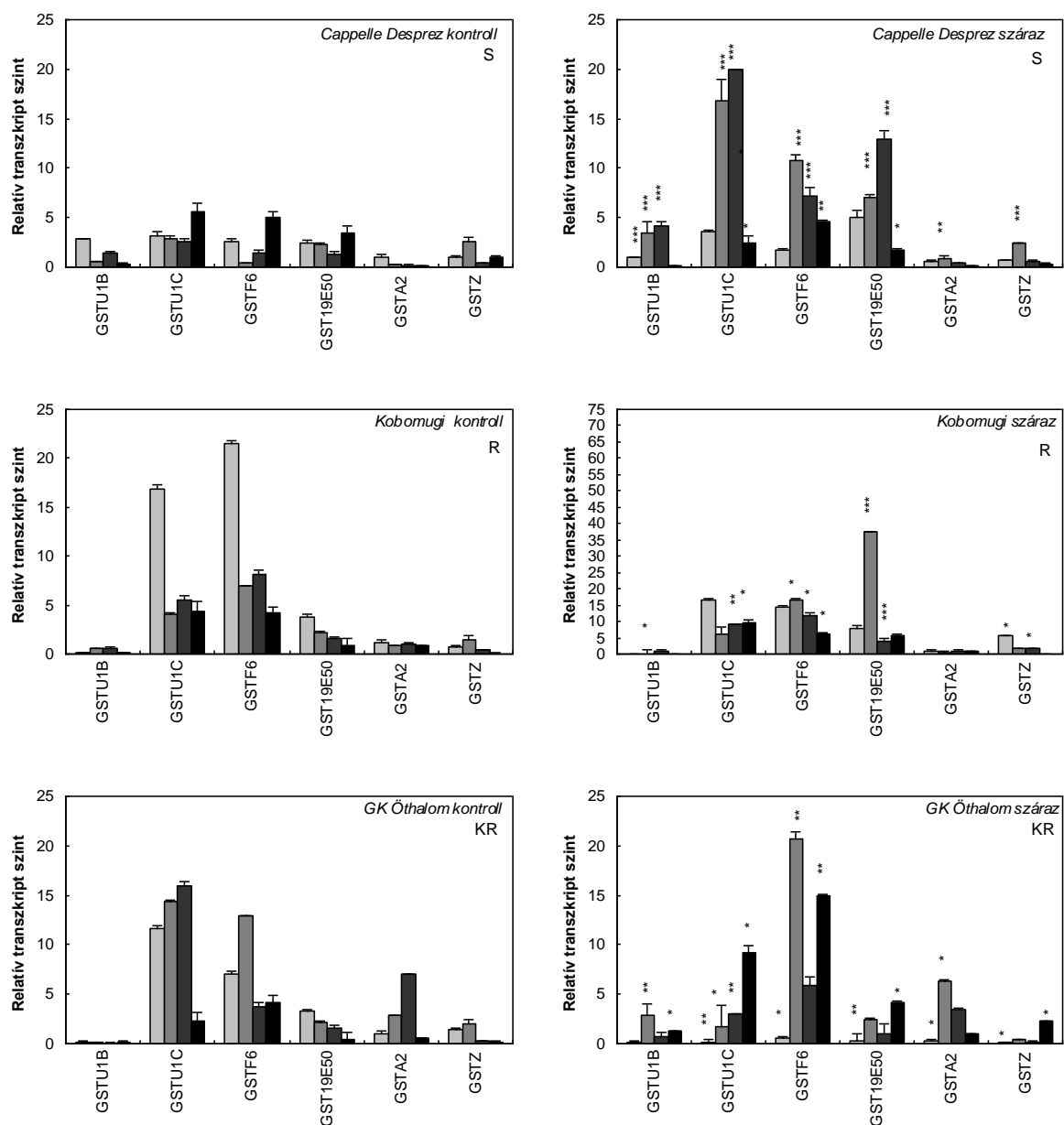
A kontroll értékek között a legmagasabb expressziós szinteket a Plainsman, GK Öthalom és Kobomugi esetében mértük (5.8. a,b ábra). Bizonyos gének indukciót mutattak idő függvényében a kontroll mintákban is. A *GSTF6* és *GSTU1B/C* esetében a GK Élet, Plainsman és GK Öthalom fajtákban detektáltunk folyamatosan emelkedő értékeket az öntözött mintákban.

A vizsgált a phi és tau csoportú *GST* génekre általában jellemző, hogy a szárazság megnövelte a transzkript szinteket. A Kobomugi kivételével minden fajta esetében szignifikánsan emelkedett *GSTU1B* transzkript szintje az öntözésmegvonást követően. Ezzel szemben az *GSTU1C* allél indukálódott Kobomugiban is, így az öntözésmegvonás hatására szignifikáns, de különböző mértékű emelkedést minden fajtában lehetett detektálni ennél az allélnál legalább két mintavételi időpontban. A legkiemelkedőbb növekedést a Kobomugi és Cappelle Desprez esetében tapasztaltuk. *GSTF6* gén expressziója szintén minden esetben indukálódott a stresszre, a szárazságindukció legmarkánsabb a Plainsman, GK Öthalom, és Kobomugi esetében volt. A Kobomugi minden fajtától különbözik a *GSTI9E50*-es gén indukciójának mértékében, itt 40-szeres indukciót mértünk szárazság hatására. A legkisebb mértékű változásokat a stressz hatására *GSTA2* és *GSTZ* mutatták. *GSTA2* a Plainsman, Cappelle Desprez és GK Öthalom esetében emelkedett meg szignifikáns mértékben egy-egy mintavételi napon. Az öntözésmegvonás hatására a *GSTZ* expressziója a Cappelle Desprez és Plainsman fajtáknál a kísérlet két utolsó mintavételi napjára represszálódott.

Összegezve megállapítható, hogy a stressz kivédésében több phi és tau csoportú *GST* mutatott magasabb expressziós szintet a szárazságtűrő fajtáknál.



5.8. a. ábra: Kontroll és szárazságnak kitett Mv Emese, GK Élet, Plainsman búzafajták zászlós levelének GST transzkript szint változása (□ antézis, ■ 4 DPA; ■ 9 DPA, ■ 12 DPA, az R, KR, S betűk a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli). A transzkript szint relatív egysége a GK Élet fajta kontroll mintáiban mért relatív transzkript szint (=1). A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), $0,01$ (**) vagy $0,001$ (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).



5.8. b. ábra: Kontroll és szárazságnak kitett Cappelle Desprez, GK Öthalom és Kobomugi búzafajták zászlós levelének GST transzkript szint változása (□ antézis, ■ 4 DPA; ■ 9 DPA, ■ 12 DPA, az R, KR, S betűk a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli). A transzkript szint relatív egysége a GK Élet fajta kontroll mintáiban mért relatív transzkript szint (=1). A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik (n=3).

5.2. Ozmotikus stressz hatása búza csíranövények fiziológiai paramétereire és GST expressziójára

5.2.1. Növekedési és vízháztartási paraméterek változása PEG-kezelt búza növényekben

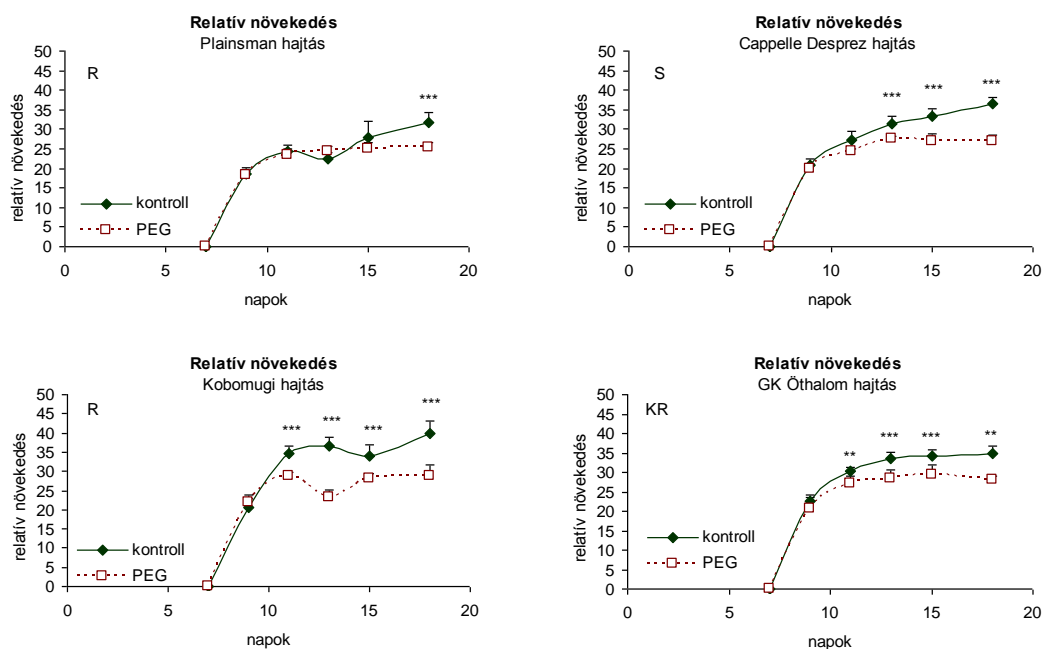
Négy búzafajta válaszreakcióit vizsgáltuk folyadék kultúrában 400 mOsm PEG kezelés hatására.

A kísérlet kezdetekor két levéllel rendelkeztek a csíranövények, az utolsó napra megjelent minden fajtánál a harmadik levél is (a leveleket minden mért paraméter esetében a megjelenés sorrendjében számoztuk).

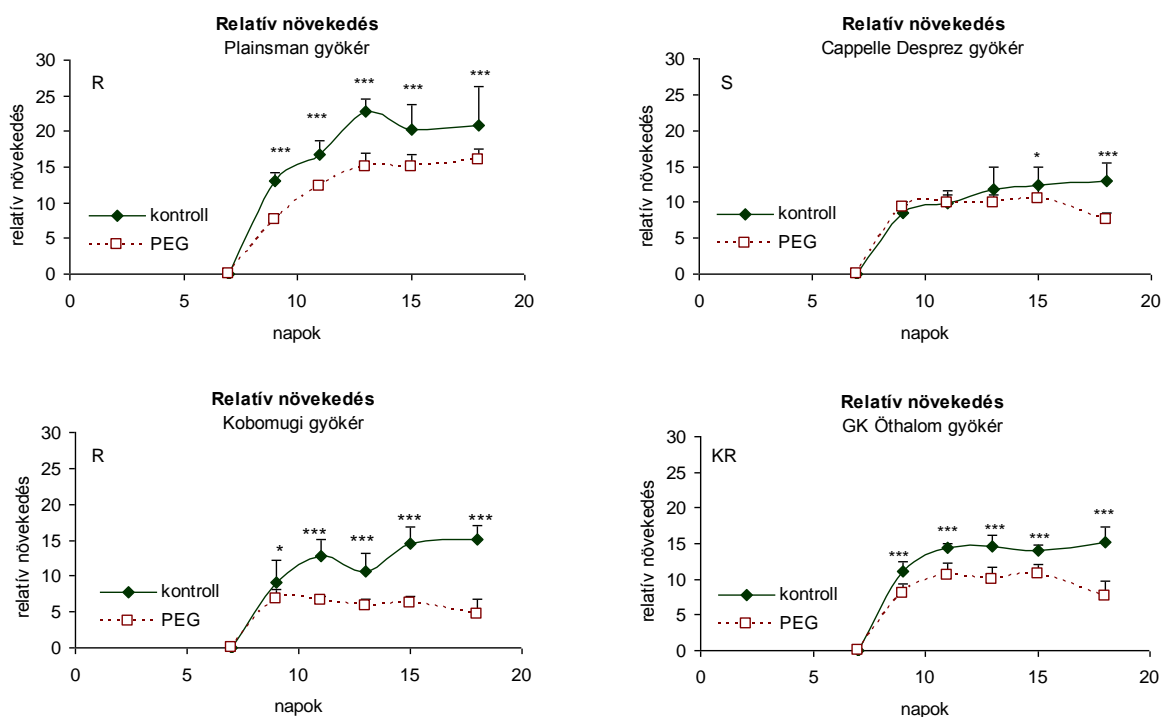
A relatív hajtásnövekedés az utolsó mintavételi napra (18. nap, 11 nappal az első, 100 mOsm-os PEG kezelés után) szignifikánsan lecsökkent mind a négy vizsgált búzafajta esetében (5.9. ábra). A tápoldat ozmolaritásának emelkedésére a Plainsman fajta csökkentette le legkésőbb a relatív növekedését, itt csak az utolsó mintavételi napra lett a különbség szignifikáns.

Mind a négy fajta esetében szignifikánsan csökkent a gyökérnövekedés (5.10. ábra), a szárazság érzékeny Cappelle Desprez reagált legkésőbb a PEG kezelésre.

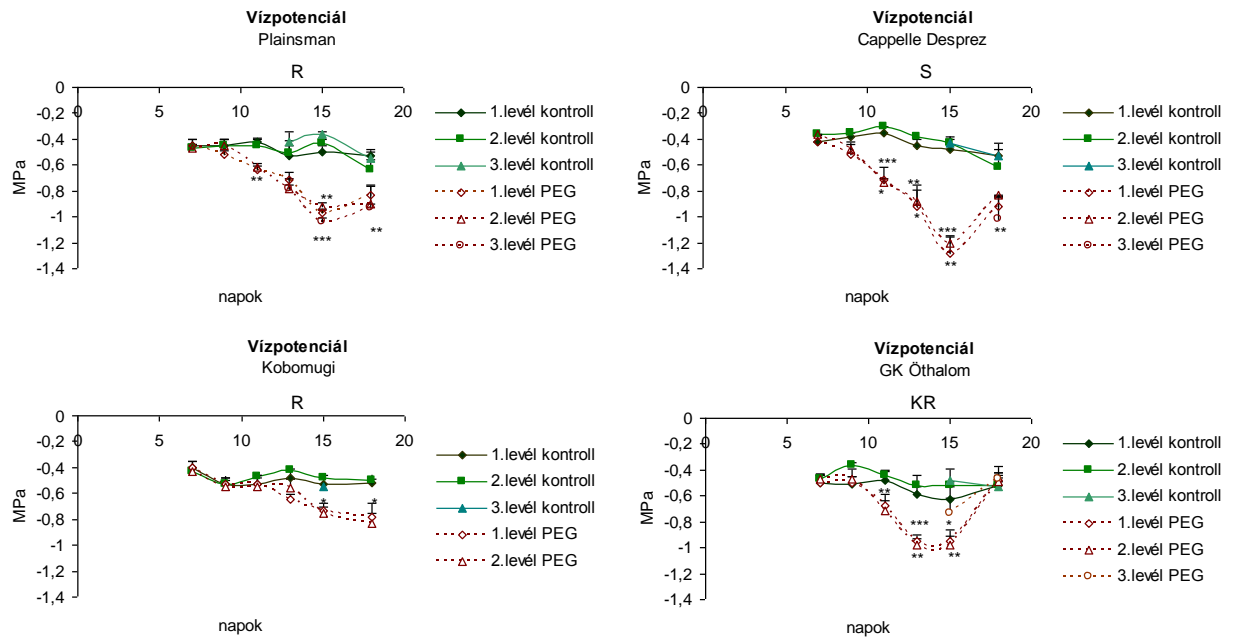
A vízpotenciál értékeket mindhárom levélen meghatároztuk (5.11. ábra). A Plainsman fajtában szignifikáns csökkenést okozott az ozmotikus stressz a 11. naptól. A 15. napra -1 MPa értékre csökkent le a vízpotenciál, majd a 18. napra kis mértékű emelkedés mutatott a 15. napi minimum értékhez képest. A legalacsonyabb vízpotenciál értékkel (<-1,2 MPa) a Cappelle Desprez fajta esetében találkoztunk a 15 napos PEG kezelt csíranövényeknél, és a vízpotenciál értékek ennél a fajtánál voltak a legalacsonyabbak minden mintavételi napon. A GK Öthalom csíranövényeknél a 13. és 15. napi -1 MPa közeli vízpotenciál a 18. napra megemelkedik és a kontrolléhoz közeli értékeket mutatott. Kobomugi fajtában kis mértékű csökkenést okozott az ozmotikus stressz, és nem találkoztunk az eddigi felsorolt fajták vízpotenciáljára jellemző akklimatizációs görbével a vizsgált időtartam alatt.



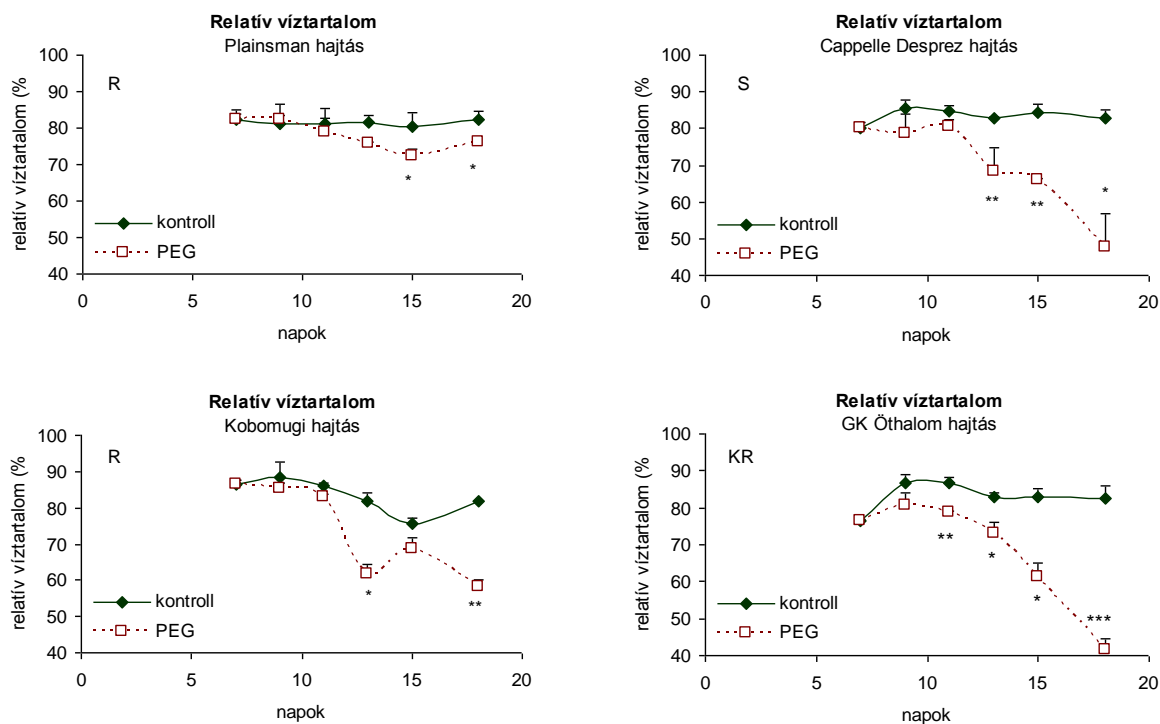
5.9. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. Plainsman, Cappelle Desprez, GK Öthalom és Kobomugi csíranövények relatív hajtásnövekedése. Az R, KR, S a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik (n=10).



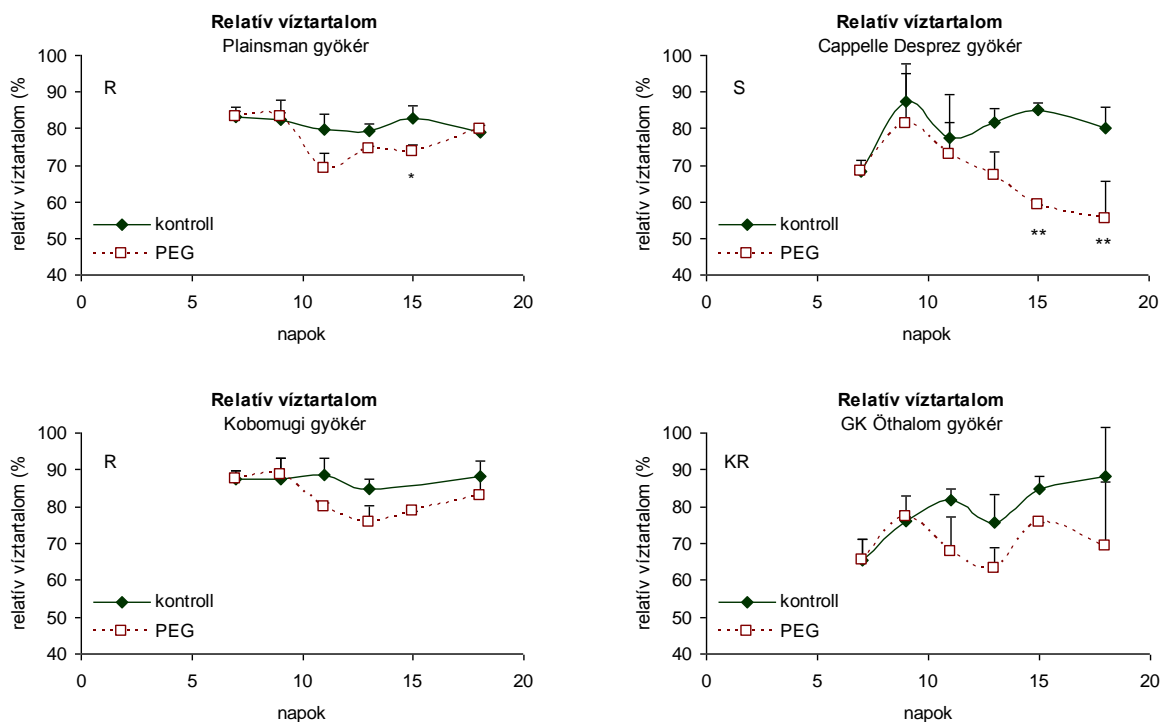
5.10. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. Plainsman, Cappelle Desprez, GK Öthalom, Kobomugi csíranövények relatív gyökernövekedése. Az R, KR, S a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik (n=10).



5.11. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. Plainsman, Cappelle Desprez, GK Öthalom, Kobomugi csíranövények vízpotenciálja mindhárom levélben. Az R, KR, S a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=10$).



5.12. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. Plainsman, Cappelle Desprez, GK Öthalom, Kobomugi csíranövények hajtásának relatív víztartalma. Az R, KR, S a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).

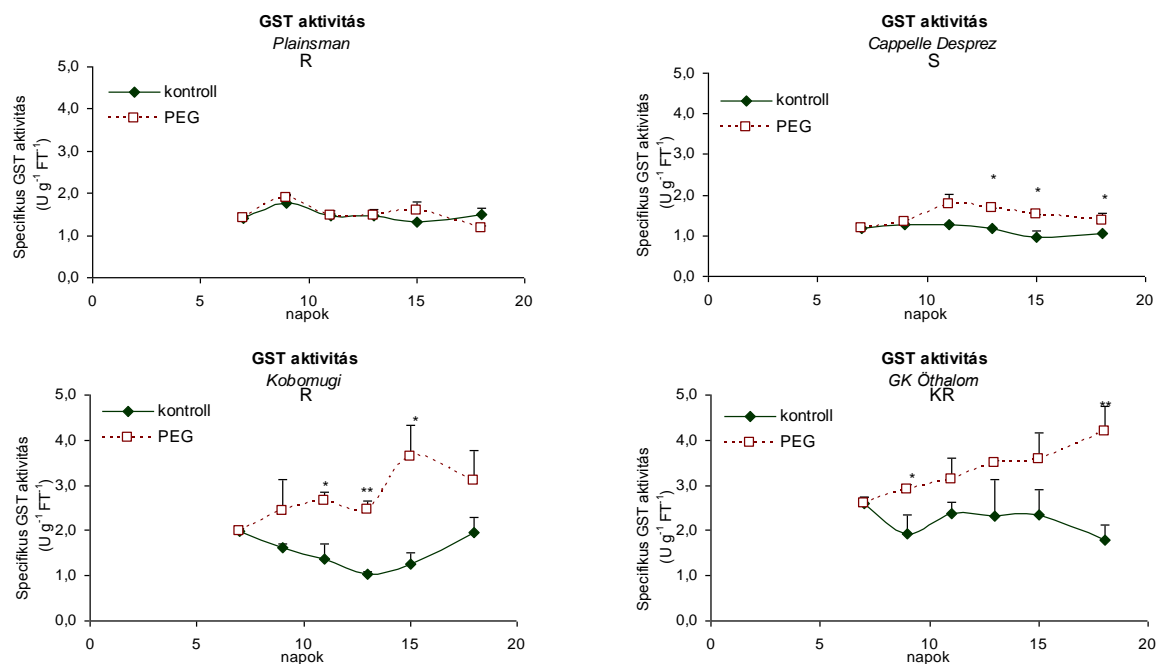


5.13. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. Plainsman, Cappelle Desprez, GK Öthalom, Kobomugi csíranövények gyökerének relatív víztartalma. Az R, KR, S a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).

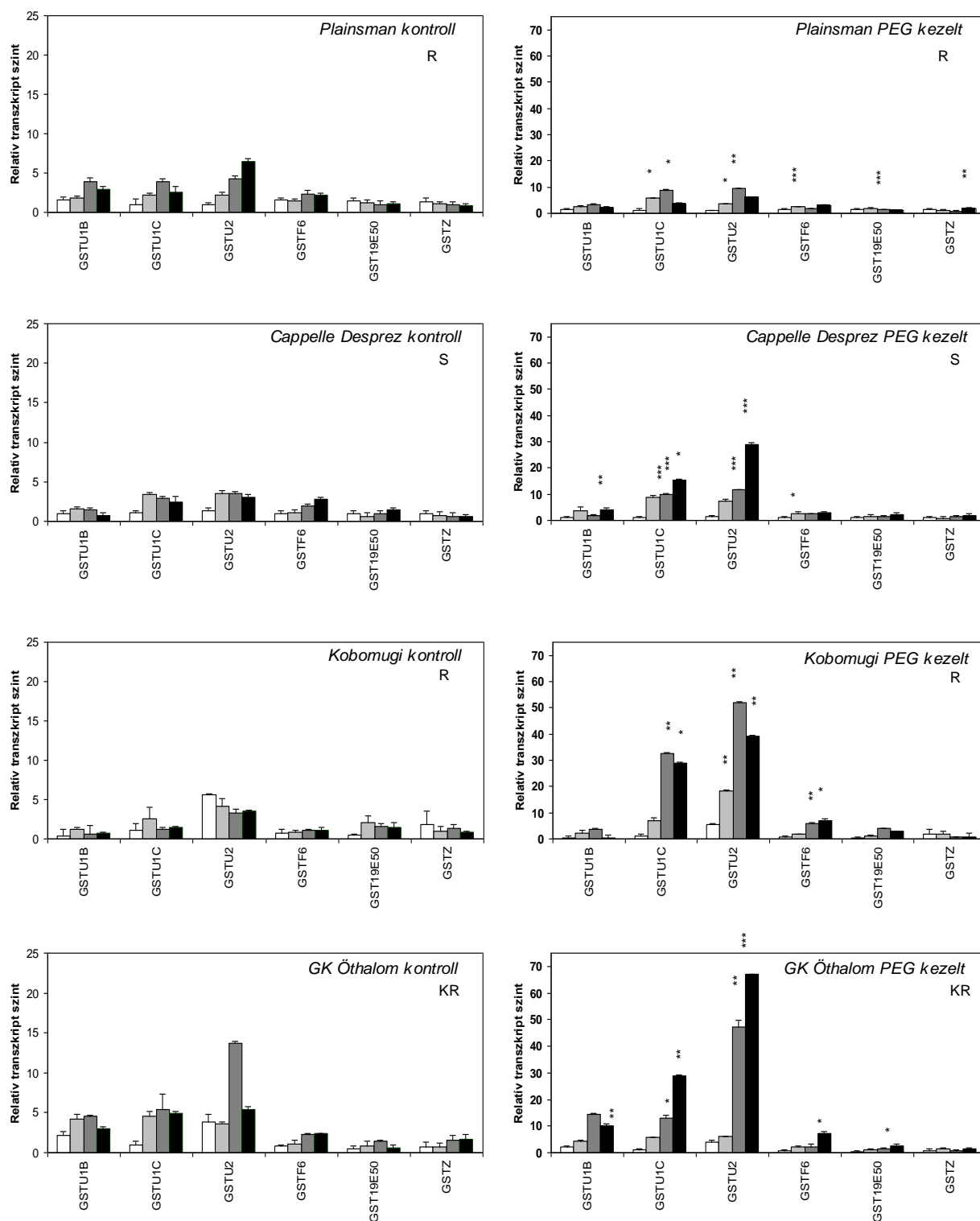
A relatív víztartalom méréseket a hajtás és a gyökér esetében is elvégeztük (5.12. és 5.13. ábra). Plainsman fajtánál mind a gyökér mind a hajtás esetében a kontrollhoz képest kis mértékű, csökkenés volt megfigyelhető, ami a gyökéren az utolsó mintavételi napra kiegyenlítődött. A Cappelle Desprez relatív víztartalma ozmotikus stressz hatására az egész növényben a 13. naptól szignifikánsan, kb. 25-30 %-kal lecsökkent. A GK Öthalom hajtásának víztartalma a 9. naptól PEG kezelés hatására nagyon jelentős (40 %-os) csökkenést mutat, míg a gyökérben kisebb mértékű, nem szignifikáns változásokat okozott a stressz. Nem mutatott szignifikáns különbséget a kontrollhoz képest az ozmotikus stressznek kitett Kobomugi gyökerének víztartalma, míg a hajtásban a 13 és 18 napos csíranövények esetében a stressz lecsökkentette a relatív víztartalmat.

5.2.2. GST aktivitás és expresszió változása PEG-kezelt búza növények gyökerében

A PEG kezelés nem okozott szignifikáns emelkedést Plainsman fajta esetében (5.14. ábra). A Cappelle Desprez GST aktivitását indukálta az ozmotikus stressz már a 11. naptól, a 200 mOsm-nak megfelelő ozmotikus stressz alkalmazása után két nappal. A Cappelle Desprez fajta esetében már az ilyen mértékű ozmolaritás emelkedés jelentős indukciót okozott a GST aktivitásban. A 13, 15. és 18. mintavételi napokon szignifikánsan magasabb volt a PEG kezelt Cappelle Desprez gyökér GST aktivitása, mint a kontroll növényeké. A GK Öthalom és Kobomugi fajta GST aktivitása a 7 napos csíranövények esetében magasabb (2,5945 és 1,9963 $\text{U g}^{-1} \text{FT}$) volt, mint a Plainsman és Cappelle Desprez fajtáké (1,4013 és 1,1809 $\text{U g}^{-1} \text{FT}$). A GK Öthalom fajta GST aktivitása 100 mOsm kezelés után két nappal a kísérlet 9. napjára megemelkedett, a kísérlet további részében a kontrollnál magasabb GST aktivitás értékeket mértünk minden mintavételi napon, a különbség a 18. napon volt ismét szignifikáns. Kobomugi fajtánál nagyobb mértékű emelkedést mértünk, ami különbség a 11, 13 és 15 napos csíranövényeknél volt szignifikáns.



5.14. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. Plainsman, Cappelle Desprez, Kobomugi és GK Öthalom specifikus GST aktivitása gyökérben. Az R, KR, S a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), $0,01$ (**) vagy $0,001$ (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).



5.15. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. Plainsman, Cappelle Desprez, Kobomugi és GK Öthalom búzafajták gyökerének GST transzkript szint változása (□ 7, ■ 9; ■ 13, ■ 15 napos búza csíranövények esetében). Az R, KR, S a szárazság rezisztens, közepesen rezisztens ill. szárazság szenzitív fajtákat jelöli. A transzkript szint relatív egysége a Cappelle Desprez fajta kontroll mintáiban mért relatív transzkript szint (=1). A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik (n=3).

Hat GST gén expresszióját vizsgáltuk meg a fiatal növények esetében, ebből öt azonos volt a kalászos búzanövények zászlóslevelén mérttel. Az eddigi kísérletben nem szerepelt a tau csoportú *TaGSTU2* gén, amely által kódolt fehérje GSH konjugáló aktivitása CDNB szubsztráttal szemben kiemelkedően magas a többi tau csoportú GST-hez viszonyítva (Thom és mtsai. 2002). Feltételeztük, hogy ennek a génnek az expressziója és a CDNB szubsztráttal mérhető GST aktivitás között valószínűleg nagyfokú korreláció mutatkozik. Ennek megfelelően *GSTU1B*, *GSTU1C*, *GSTF6*, *GST19E50*, *GSTZ* mellett *GSTU2* expresszió változásait határoztuk meg ozmotikus stressz alatt.

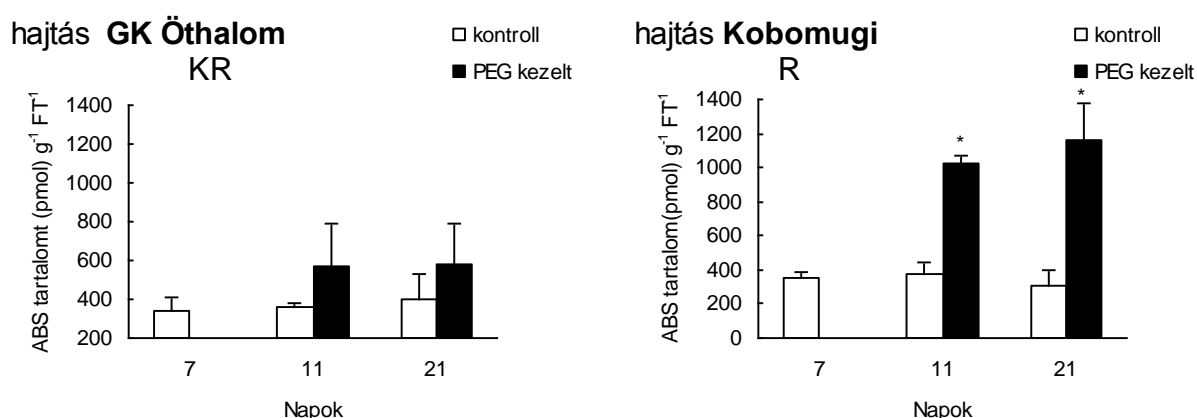
Ozmotikus stressz hatására szignifikánsan megemelkedett a tau csoportú *GSTU1C*, *GSTU2* és a phi csoportú *GSTF6* expressziója minden fajtában (5.15. ábra). A legkisebb változások a Plainsman növényekben mutatkoztak PEG kezelés hatására. Kis mértékben megemelkedett *GSTU1C* és *GSTU2* transzkript szintje, de a különbség a kontrollhoz képest az utolsó mintavételi napon már nem volt szignifikáns. Egy-egy mintavételi napon indukálódott stressz hatására *GSTF6*, *GST19E50* és *GSTZ* transzkript szintje a kontrollhoz képest. Nagyobb indukciók mutatkoztak a Cappelle Desprez fajtában ozmotikus stressz hatására. Szignifikánsan megemelkedett a *GSTU1C*, *GSTU2* és az utolsó mintavételi napra a *GSTU1B* gén transzkript szintje. *GSTF6* egy ponton, a kilencedik napon, a kísérlet elején indukálódott. GK Öthalom az utolsó mintavételi napra több mint 60-szorosra megemelkedett *GSTU2* transzkript szintje az ozmotikus stressz hatására. Jelentős emelkedés mutatott még a kezelés hatására *GSTU1* két allélja ebben a fajtában. Az utolsó napra indukálódott *GSTF6* és *GST19E50* expressziója is GK Öthalomban. Kobomugi fajtában szintén a *GSTU2* mutatott jelentős emelkedés ozmotikus stressz hatására, de az utolsó mintavételi napra már mindkét gén esetében csökkent az indukció a 13. napihoz képest (5.15. ábra).

5.3. Ozmotikus stressz hatása az abszcizinsav tartalomra, bioszintézisére és a sztómakonduktivitásra

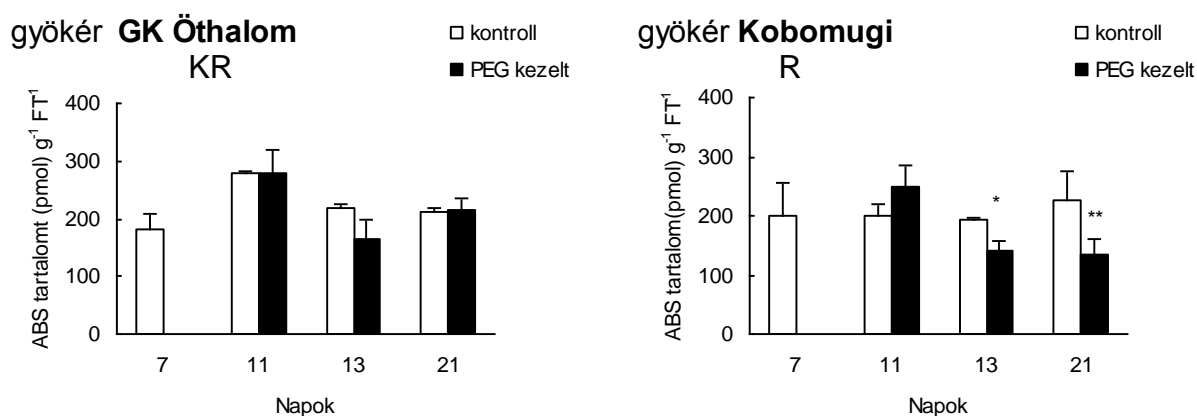
Eddigi irodalmi adatok alapján a GST gének expressziójának szabályozásában szerepet játszik az abszcizinsav fitohormon. Exogén ABS kezelés indukálta a tau csoportú *TtGSTU1* és *U2* gén expresszióját, illetve a gén promóter régiójában ABS függő *cis* reguláló elem található. A ozmotikus stressz hatására legmagasabb GST aktivitás és expresszió indukciót mutató két fajtában (GK Öthalomban és Kobomugiban) megmértük gyökérben és hajtásban az ABS tartalom változását (5.17. és 5.16. ábra).

Ozmotikus stressz hatására szignifikánsan megemelkedik a levelek ABS tartalma Kobomugi fajtában a 200 mOsm-os PEG kezelés után két nappal és a 21. napon mérve is. A GK Öthalom hajtásának ABS tartalma nem szignifikáns emelkedéseket mutatott, a 13. napon csökkent, míg a 21. napon nem volt szignifikáns különbség a kontrollhoz képest.

A gyökér ABS tartalma stressz hatására a 13. naptól csökken a Kobomugi fajta esetében, míg a GK Öthalom gyökerekben a 13. napi nem szignifikáns csökkenés kivételével a kontrollhoz közeli értékeket mutatott (5.17. ábra).



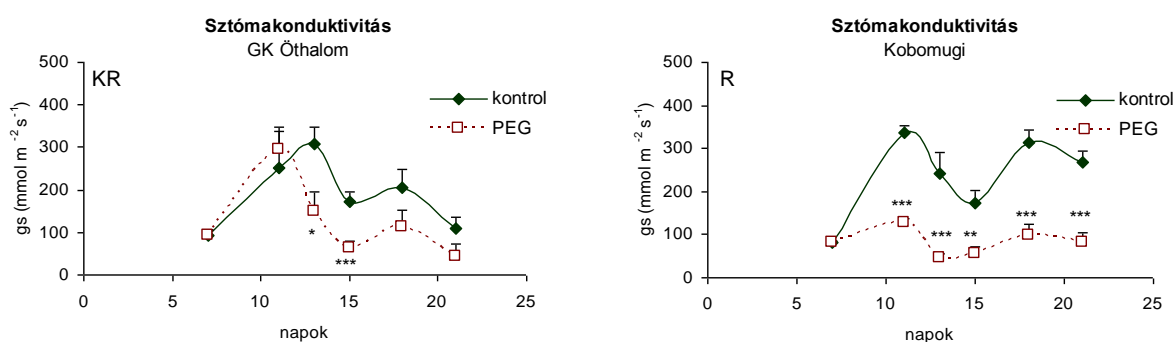
5.16. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. GK Öthalom (közepesen szárazságtűrő, KR) és Kobomugi (szárazságtűrő, R) ABS tartalma a hajtásban. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), $0,01$ (**) vagy $0,001$ (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).



5.17. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. GK Öthalom (közepesen szárazságtűrő, KR) és Kobomugi (szárazságtűrő, R) ABS tartalma gyökérben. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), $0,01$ (**) vagy $0,001$ (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).

A sztómakonduktivitás értéke a sztóma zárósejtek vízpotenciáljával, a sztómák nyitott állapotával mutat korrelációt. Meghatároztuk a sztómakonduktivitást a levelek ad-, illetve abaxiális felszínén és az összesített értékeket ábrázoltuk (5.18. ábra).

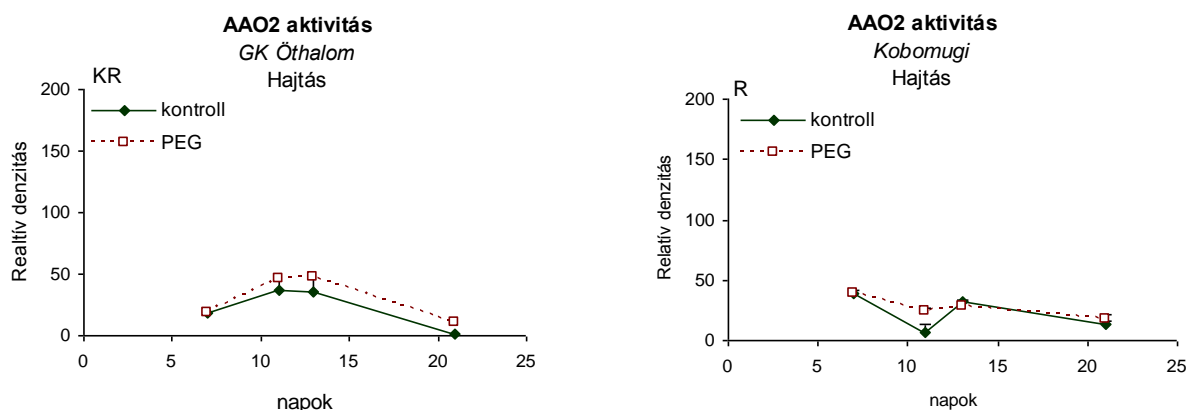
Szembetűnő a Kobomugi fajta gyorsabb és erőteljesebb sztómazáródása ozmotikus stressz hatására. A GK Öthalom időben később és kevésbé hatékonyan reagál, a PEG-kezelt GK Öthalom növényeknél a 15. napra csökken le $100 \text{ mmol cm}^{-2} \text{ s}^{-1}$ alatti értékre, míg a Kobomuginál végig ilyen alacsony értéket mértünk a stresszkezelt növényeknél. Az adatok alapján megállapíthatjuk, hogy a stressz korai szakaszában a Kobomugi gyors sztómazáródása lehetővé teszi a vízpotenciálvesztés elkerülését.



5.18. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. GK Öthalom (közepesen szárazságtűrő, KR) és Kobomugi (szárazságtűrő, R) első levelének sztómakonduktivitása. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).

Megvizsgáltuk, hogyan változik az ABS szintézisének egyik regulációs pontját és sebesség-meghatározó lépését jelentő aldehid oxidáz enzim aktivitása.

Az aldehid oxidáz aktivitás vizsgálat a hajtásban két izoenzim jelenlétét mutatta ki. Mindkét fajtában az idő függvényében az aldehid oxidáz aktivitás a levelekben csökkenést mutatott (5.19. ábra). Mindkét fajtában az utolsó mintavételi napon nagyon alacsony aktivitás volt detektálható. A szárazságstressz nem okozott jelentős aktivitásbeli különbséget a hajtásban.

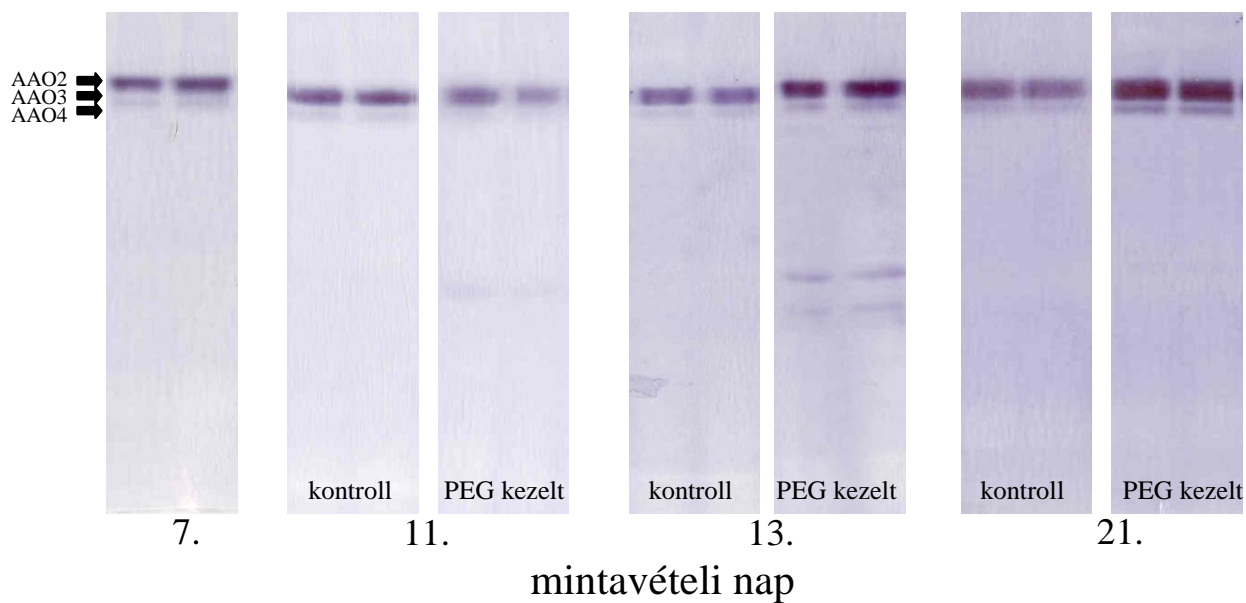


5.19. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. GK Öthalom (közepesen szárazságtűrő, KR) és Kobomugi (szárazságtűrő, R) specifikus aldehid oxidáz aktivitása 2. levélen. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).

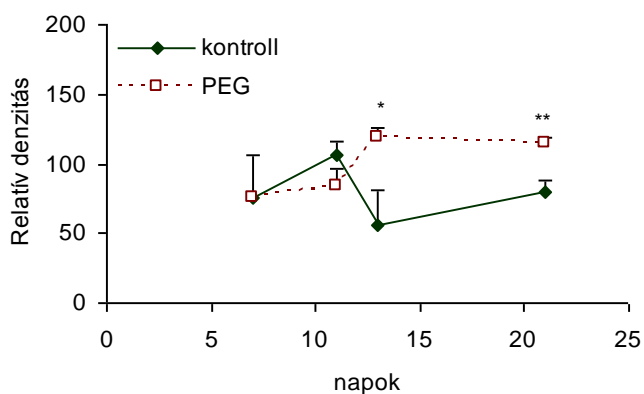
A gyökér vizsgálata során hét izoenzim aktivitása jelentkezett a GK Öthalomban és eggyel kevesebb a Kobomugi fajtában (5.20, 5.21. ábra). A kísérleteinkben használt szubsztráttal, az indol-3-aldehiddel az AAO1 izoenzim nem mutat aktivitást, így az aktivitásgélen az AAO2, 3 és 4 vannak feltüntetve. Az abszcizin aldehid szubsztrátot Poaceae esetében az AAO2 izoenzim oxidálja (Omarov és mtsai. 2003), így az ABS bioszintézishez ez az izoenzim kapcsolható. A kontroll növények gyökereiben is viszonylag magas aktivitással rendelkezik a kettes és a hármas izoenzim, amelyek aktivitása a Kobomugiban hamarabbi és erőteljes indukciót mutat PEG kezelés hatására. A GK Öthalom fajta aldehid oxidáz 2, 3 és 4 izoenzime ozmotikus stresszre a kontrollhoz képest erősebb aktivitást mutatott a 400 mOsm kezelés után két és tíz nappal, a 13. és a 21. napon.

Az ABS bioszintézisének több regulációs lépése is van, az utolsó, a fiziológiailag aktív hormon szintézisét meghatározó lépése döntő fontosságú. A sztómák záródásának kiváltásában a gyökerek által *de novo* szintetizált és xilémtranszport által a levélsejtek apoplasztjáig szállított ABS nagy jelentőségű a zárósejtek turgorvesztését előidéző jelátviteli folyamatok indukálásában.

Kobomugi

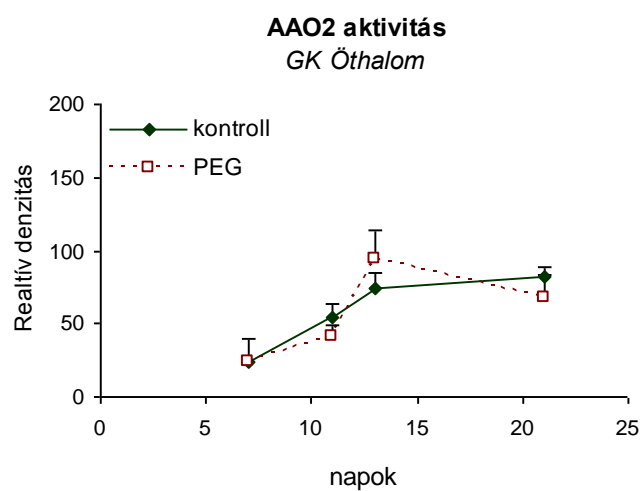
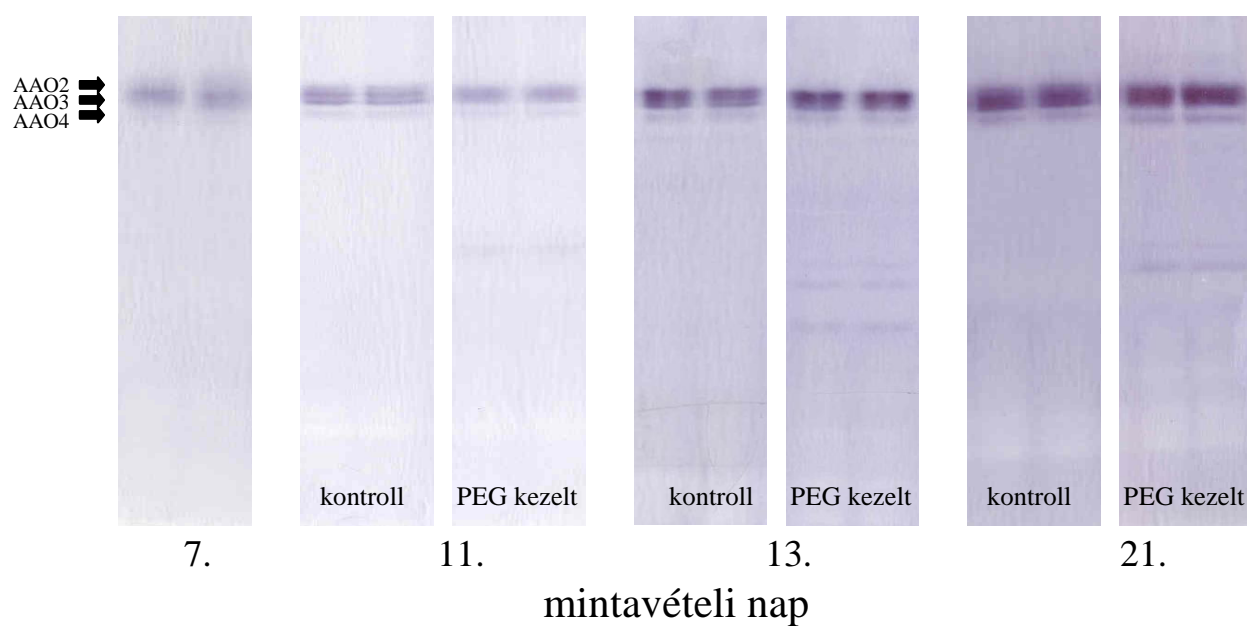


AAO2 aktivitás Kobomugi



5.20. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. Kobomugi aldehid oxidáz aktivitása gyökérben. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).

GK Öthalom



5.21. ábra: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. GK Öthalom aldehyd oxidáz aktivitása gyökérben. A *-gal jelölt minta az aznapi kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik ($n=3$).

5.4. Ozmotikus stressz hatása a glutation peroxidáz és glutation transzferáz

aktivításra

Az aldehid oxidáz és ABS mérésekkel azonos mintavételi napokon megmértük a Kobomugi és a GK Öthalom csíranövények hajtásának és gyökerének GPOX és GST aktivitását. A legtöbb esetben kezeléstől függtelenül a hajtásban alacsonyabb GPOX és GST aktivitás értékeket mértünk, mint a gyökérben. Mindkét enzim aktivitása Kobomugi fajtában a gyökérben és a hajtásban is indukálódott ozmotikus stressz hatására minden mintavételi napon. GK Öthalom estében a hajtásban a GST és GPOX aktivitás hasonló tendenciát mutatott, stressz hatására indukálódott, majd a 13. és 21. napon a kontrollénál alacsonyabb volt a kezelt minták aktivitása, míg a gyökérben minden mintavételi napon emelkedtek az enzimaktivitás értékek (5.1. táblázat).

Specifikus GPOX aktivitás ($\text{U g}^{-1} \text{FT}^{-1}$)		Mintavételi napok			
Hajtás	7	11	13	21	
Kobomugi kontroll	48,46 \pm 0,59	54,80 \pm 13,80	50,67 \pm 1,35	65,97 \pm 12,94	
Kobomugi PEG kezelt	48,46 \pm 0,59	96,33 \pm 11,44	71,54 \pm 12,69	71,31 \pm 11,25	
GK Öthalom kontroll	57,68 \pm 2,12	61,75 \pm 31,40	57,36 \pm 5,33	69,57 \pm 6,37	
GK Öthalom PEG kezelt	57,68 \pm 2,12	65,70 \pm 23,00	57,31 \pm 3,32	52,13 \pm 12,00	
Gyökér	7	11	13	21	
Kobomugi kontroll	60,43 \pm 23,78	62,52 \pm 12,93	60,06 \pm 4,02	68,41 \pm 3,30	
Kobomugi PEG kezelt	60,43 \pm 23,78	92,23 \pm 22,21	91,00 \pm 2,39	85,76 \pm 33,48	
GK Öthalom kontroll	68,36 \pm 27,89	60,08 \pm 15,01	69,73 \pm 5,05	63,10 \pm 38,02	
GK Öthalom PEG kezelt	68,36 \pm 27,89	66,00 \pm 4,35	72,45 \pm 21,56	70,80 \pm 26,44	
Specifikus GST aktivitás ($\text{U g}^{-1} \text{FT}^{-1}$)					
Hajtás	7	11	13	21	
Kobomugi kontroll	0,7985 \pm 0,04	0,9849 \pm 0,15	0,7827 \pm 0,08	1,4654 \pm 0,07	
Kobomugi PEG kezelt	0,7985 \pm 0,04	1,0822 \pm 0,11	0,9598 \pm 0,16	1,7077 \pm 0,16	
GK Öthalom kontroll	0,6063 \pm 0,04	0,5220 \pm 0,08	0,8087 \pm 0,09	1,4174 \pm 0,17	
GK Öthalom PEG kezelt	0,6063 \pm 0,04	0,7380 \pm 0,10	0,7709 \pm 0,04	1,2528 \pm 0,21	
Gyökér	7	11	13	21	
Kobomugi kontroll	1,9963 \pm 0,05	1,3695 \pm 0,34	1,0340 \pm 0,07	1,7616 \pm 0,16	
Kobomugi PEG kezelt	1,9963 \pm 0,05	2,6594 \pm 0,19	2,4665 \pm 0,19	3,1978 \pm 1,07	
GK Öthalom kontroll	2,5945 \pm 0,13	2,3746 \pm 0,24	2,3125 \pm 0,83	2,2062 \pm 0,70	
GK Öthalom PEG kezelt	2,5945 \pm 0,13	3,1405 \pm 0,45	3,4798 \pm 0,06	4,0252 \pm 0,77	

5.1. táblázat: Kontroll és 400 mOsm PEG kezelésnek kitett *Triticum aestivum* cv. Kobomugi és GK Öthalom specifikus GPOX és GST aktivitása hajtásban és gyökérben.

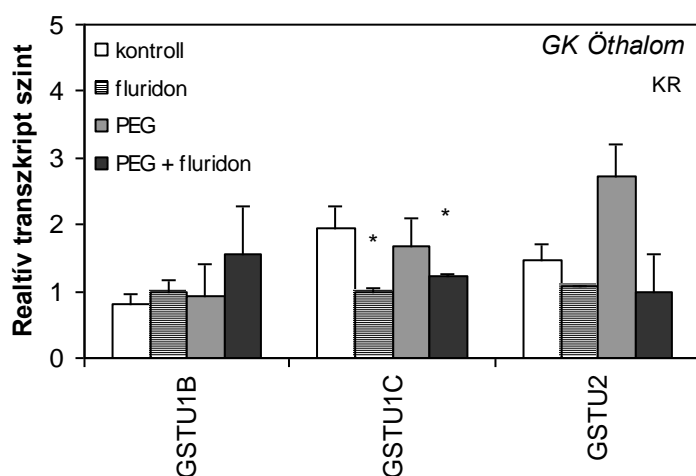
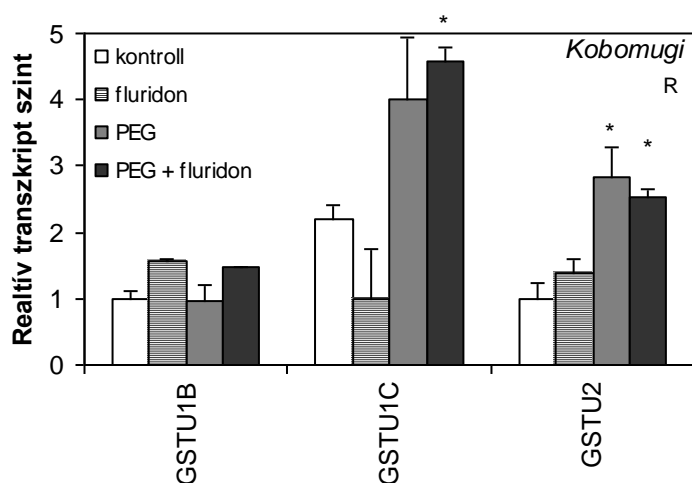
5.5. Az ABS bioszintézis gátlás hatása *GSTU1* és *U2* gének expressziójára

Az ABS bioszintézis gátló fluridont a növények tápoldatához adtuk, hatását rövid távú, 24 órás kezelés esetén tanulmányoztuk. Egy hetes GK Öthalom és Kobomugi csíranövényeket kezeltünk 5 mg L^{-1} fluridonnal egy napig, párhuzamosan, illetve együttes

alkalmazással a 200 mOsm-os ozmotikus stressz hatását vizsgáltuk. A kísérlethez a két, ozmotikus stresszre legjelentősebb indukciót mutató tau csoportú gént, a *GSTU1* és *U2*-t használtuk fel.

A vizsgált gének közül egyik sem mutatott szignifikáns expresszió csökkentést fluridon kezelés hatására a Kobomugi fajtában. A *TaGSTU1C* és *TaGSTU2* transzkript szintje PEG kezelés hatására megemelkedett, és az indukció fluridon jelenlétében (PEG és fluridon együttes alkalmazásakor) is megfigyelhető volt (5.22. ábra).

A fluridon kezelés hatására a *TaGSTU1C* expressziója a kontrollhoz képest szignifikánsan csökkent GK Öthalom esetében, az egy napig tartó ozmotikus stressz nem okozott transzkript szint változást, vagyis a kontrollhoz hasonló értékeket lehetett detektálni a PEG kezelt minták esetében is, a PEG és fluridonnal egyidejűleg kezelt mintákban pedig szintén szignifikánsan csökkent az expresszió. A *TaGSTU2* esetében 24 óra PEG kezelés hatására megnövekedett a transzkript szint, amely növekedés fluridon jelenlétében nem volt megfigyelhető.



5.22. ábra: Kontroll, fluridon kezelt, 200 mOsm PEG kezelt és fluridon + PEG együttes kezelésnek kitett GK Öthalom (közepesen szárazságtűrő, KR) és Kobomugi (szárazságtűrő, R) búzafajták gyökerének GST transzkript szint változása. A *-gal jelölt minta a kontrolltól $P \leq 0,05$ (*), 0,01 (**) vagy 0,001 (***) valószínűségi szinteken szignifikánsan különbözik (n=3).

6. Eredmények értékelése

6.1. Szárazságstressz hatása különböző szárazságtűrűsű búza növények zászlós

leveleinek öregedési folyamatára, fiziológiai paramétereire és GST expressziójára

Antézis után a zászlóslevél szenescenciájának hossza és lefutása a hozam meghatározó tényezője, amit jelentősen befolyásol a szárazságstressz. A kísérleteink mintavételei az antézistól a 12. napig (12 DPA) a búzaszem feltöltődésének két korai szakaszát érintették: a korai tejes érési (1-10. DPA) és a tejes érési (11-16. DPA) fejlődési szakaszokat. A sejten belül rengeteg gyors változást indukál az öregedési folyamat, amely szabályozásában sok fehérje szerepet játszik. Az idő előtti sejthalál kivédésében nagy jelentősége van az oxidatív stressz ellen védő mechanizmusoknak, mert például késleltetett öregedésű mutáns növények fokozott védekező képességgel rendelkeznek (Woo et al. 2004).

Szárazság esetén a növények eltérő stratégiával reagálnak a stresszre, az egyes fajok, sőt fajták esetében is megfigyelhetünk különbséget, pl. az öregedés, a monokarpikus szenescencia folyamatában bekövetkezett változásoknál (Yang és mtsai. 2006). Kunieda és munkatársai (2005) levágott árpa levelek öregedését tanulmányozva megállapították, hogy az öregedés során a klorofill tartalom csökkenésével párhuzamosan a CDNB szubsztráttal mért GST aktivitás megemelkedik, véleményük szerint a GST, mint „takarító” enzim működik az öregedés alatt, és szerepe elsősorban az endogén metabolitok eltávolításában, esetleg detoxifikálásában lehet. A levél öregedési folyamatainak megkezdődését számos fiziológiai paraméter megváltozása jelzi, például a klorofill *a+b* és karotinoid tartalom csökkenése, illetve a lipidperoxidáció során keletkező malondialdehid szintjének emelkedése. Ezeket a paramétereket a szenescencia indikátoraiként is használják (Yang és mtsai. 2001).

Kísérleteink során ezen szenescencia paraméterekben szignifikáns csökkenést tudtunk kimutatni a korai szemfeltöltődés idején, az antézist követő 12 nap során az Mv Emese és Cappelle Desprez fajtákban a kontroll és a szárazságnak kitett mintákban is, illetve az MDA szint megemelkedett a Plainsman fajtánál. A zászlóslevél szenescenciája Mv Emese fajtában és feltehetően Cappelle Desprez és Plainsman esetében is már a korai szemfeltöltődési periódusban megindul. Eredményeink szerint az említett fajtáknál nem jelentkezett szárazság hatására felgyorsult öregedési folyamat, mivel az öntözött és a száraz növények pigmenttartalmának változása között szignifikáns különbséget nem találtunk (5.2 -5.4 ábra).

A malondialdehid tartalom az öregedés mellett oxidatív stressz fellépése esetén is megemelkedik, így a szárazságstresszel együtt járó oxidatív stressz, a megemelkedett lipid peroxidáció mértékét is jelezheti (Uchida, 2003). A GK Öthalom fajta esetében az MDA tartalom a szárazságnak kitett mintákban minden mintavételi napon szignifikánsan megemelkedik a kontrollhoz képest, ami jelentős oxidatív stresszre és membránkárosodásokra utal.

Az Mv Emese zászlóslevelében a szeneszencia kialakulásával a össz GST aktivitásban csak kismértékű változás történik mind a kontroll, mind a szárazságkezelt növényekben, míg a glutation peroxidáz aktivitás megemelkedik az antézis napi értékhez képest mind a kontroll, mind a szárazságstresszelt mintákban. A szeneszencia paraméterek alapján öregedést mutató másik fajtában, a Cappelle Desprezben szignifikáns változásokat csak a GPOX aktivitásban tapasztaltunk, az antézis időpontjában, illetve négy nappal utána. Az irodalmi adatokkal ellentétben a GST aktivitás az Mv Emese és Cappelle Desprez fajták esetében a korai szemfeltöltődési periódusban nem emelkedett a pigmenttartalommal fordított arányban, feltehetően a szeneszencia iniciációjának ezen a kezdeti pontján a szignifikáns GST aktivitás indukció még nem jelentkezik.

A szárazságtoleráns Plainsman fajtában lehetett mérni a legmagasabb GST és GPOX aktivitásokat az antézis időpontja után a kontroll és a szárazságstressznek kitett mintákban is. Az antézis napi jelentős indukció mindkét aktivitásban összekapcsolható a hatékony oxidatív stressz elleni védekezéssel (az antézis előtt kb. 6 nappal történt az öntözés-szétválasztás). A toleráns Kobomugi növényekben is jelentősen megemelkedett a GST aktivitás, ami a sejtszintű detoxifikálás optimális működését jelzi. A szárazságra érzékeny GK Öthalom fajtában a szárazság hatására változatlan GST aktivitás és megemelkedett MDA tartalom pedig arra utal, hogy ennek a fajtának az oxidatív stressz elleni védekezése kevésbé sikeres.

A GK Élet fajtában az antézis utáni 12. napra szárazság hatására megemelkedő MDA tartalom és GST aktivitás feltehetően a stressz folyamatokkal kapcsolható össze, hiszen szignifikáns változások nem történtek a pigment tartalomban. A fajta érzékenységet indikálja a glutation peroxidáz enzim aktivitásának szignifikáns csökkenése az öntözésmegvonás hatására.

Számos irodalmi adat áll rendelkezésre a zéta csoportú GSTk szeneszenciában betöltött szerepével kapcsolatban. A szegfű öregedési folyamatai alatt zéta csoportú GST felhalmozódását figyelték meg, *Arabidopsisban* a GSTZ1 enzim fenilalanin és tirozin degradációjában betöltött szerepe bizonyosodott be (Itzhaki és mtsai. 1994).

Kísérleteinkben a vizsgált búzafajták *GSTZ1* génjének transzkript szintje egy-egy mintavételi napon kismértékben emelkedett meg a stressz hatására, de expressziója a kísérlet során viszonylag állandónak mutatkozott minden fajtában. A vizsgált periódusban szeneszcenciával összekapcsolható változások nem jelentek meg a zéta csoportú gén expressziójában.

A virágzás utáni, monokarpikus öregedéshez kapcsolódó gének azonosítására búza zászlóslevelein transzkriptum analízist végeztek, mely során egy tau és két phi csoportú gén transzkript szintjének folyamatos emelkedését figyelték meg a zászlóslevél szeneszcenciája alatt (Gregersen és Holm, 2007). Az előbbi kísérletben szereplő öregedési folyamathoz kapcsolódó tau csoportú gén, *TaGSTU1*, a búza GST gének közül a legnagyobb hasonlóságot mutatja az árpaiban azonosított „senescence induced GST” (SIGST) génnel (Kunieda és mtsai. 2005). A korai szemfeltöltődési periódusban a *TaGSTU1B* és *TaGSTF6* gén transzkript szintje az öntözött GK Élet és Plainsman zászlósleveleiben emelkedést mutatott az idő függvényében. A szeneszcencia paraméterek alapján az Mv Emese és Plainsman fajták öregedési folyamata kezdődött meg a kísérletünk időtartama alatt, ami arra utal, hogy *TaGSTU1* gén szeneszcenciához kapcsolható transzkript szint emelkedéseinek megjelenése búza esetében fajtafüggő, illetve bizonyos fajtákban fény derült a *TaGSTF6* gén öregedési folyamattal kapcsolatos funkciójára.

























Különböző stresszhatásokra a GST génexpresszió igen nagy variabilitást mutat. A transzkripció szabályozása még az egy csoporton belüli GSTknek sem azonos, sőt még a génduplikációval létrejött, nagyfokú szekvencia- és funkcionális homológiát mutató GSTk között is előfordul, hogy bizonyos stresszor fellépésekor különböző expressziós mintázatot mutatnak (Wagner és mtsai 2002).





A phi és tau csoportú GST fehérjék az oxidatív stressz alatt variábilis szabályozó és katalitikus funkciókat látnak el (Kilili és mtsai. 2004; Soranzo és mtsai. 2004). A szárazságstressz a tau és phi csoportba tartozó GST gének transzkript szint növekedését is indukálta, de általában fajtánként különböző gének mutattak (eltérő mértékű) indukciót a stresszhatásra (6.1. táblázat). Egy fajtapáros képez kivételt, az Mv Emese és a GK Élet, esetükben a stressz hatására transzkriptszint emelkedést mutató GST gének (*TaGSTU1B/C*, *TaGSTF6* és *TaGST19E50*) azonos mintavételi napokon mutattak indukciót. Hasonló expressziós mintázatot mutatott a GK Öthalomban 2 phi csoportba tartozó gén (*TaGSTF6* és *TaGST19E50*), illetve a Plainsman fajtában különböző csoportba tartozó GST gének (*TaGSTU1B* és *TaGSTF6*), ami alapján feltételezhető hasonló regulációjuk szárazságstressz alatt.

A kísérletünkben felhasznált búzafajták zászlós levelében végbemenő hormonális változásokról Guóth és mtsai 2009-ben megjelent közleményében számol be. A szárazságnak kitett növények zászlóslevelének az ABS tartalma az Mv Emese, GK Élet és Plainsman esetében az antézis utáni 9. mintavételi napra lecsökken, amit Plainsman esetében egy határozott emelkedés követ, Mv Emese és GK Élet esetében az emelkedés később, az antézis utáni 20. nap körül figyelhető meg. Párhuzam vonható a GST expresszió és az említett fajták ABS tartalma között, ami a GSTk sokrétű szabályozásának egyik eleme (Xu és mtsai. 2002).

Szárazságstressz hatására a fajták többségében a legkiemelkedőbb transzkript szint emelkedéseket a *TaGSTF6* és *TaGSTU1B/C* esetében figyeltük meg, ami a gének stresszválaszban betöltött jelentős szerepére utal. A két, szárazság hatására is változatlan ezerszemtömeget mutató fajta, a Plainsman és Kobomugi stressz válaszainak különbözősége abban is megmutatkozott, hogy szárazság hatására a phi és tau csoportokon belül eltérő GST gének indukálódtak.

Kobomugi esetében két GST gén expressziós szintje/kifejeződése (*TaGSTU1C* és *TaGSTF6*) kiemelkedően magas volt mind a kontroll, mind a szárazságstresszelt növények esetében az antézis idején, a kontroll mintákban a kísérlet további időpontjaira csökkent az expressziójuk. Ennek az oka lehet egy virágzással összefüggő fluktuáció, de lehet a fajtára jellemző szárazság adaptációs folyamat eredménye is, amely a fajta természetes és/vagy mesterséges szelekciója során alakult ki.

Fajták	GSTU1B	GSTU1C	GSTF6	GST19E50
Mv Emese				
GK Élet				
Plainsman				
Cappelle Desprez				
Kobomugi				
GK Öthalom				

6.1. táblázat: A vizsgált phi és tau csoportú búza GST gének transzkript szintjeiben szárazságstressz hatására bekövetkezett változások egyszerűsített sémája. Jelölések: nem történt szignifikáns változás() ,a relatív egységhez képest tízszeresnél kisebb () , harmincszorosnál kisebb () , harmincszorosnál nagyobb () emelkedést mutatott a transzkript szint.





















6.2. Ozmotikus stressz hatása búza csíranövények fiziológiai paramétereire és GST expressziójára

A növények egy része képes a szöveti vízpotenciál csökkenését tolerálni, míg a magasabbrendű növények egy másik csoportja, az izohidrikus növények, a talaj vízpotenciáljának csökkenése ellenére képesek a szövetek vízpotenciálját megőrizni (Tari és mtsai. 2003). Kísérletünkben PEG kezelés hatására bekövetkező változások a vízpotenciálban három búzafajta esetében a stresszválasz általános sémáját követték. A Plainsman, a Cappelle Desprez és az GK Öthalom vízpotenciálja ozmotikus stressz hatására egy minimum érték elérése után emelkedni kezdett. A legalacsonyabb értéket (-1,2 MPa) a szenzitív Cappelle Desprez esetében lehetett megfigyelni. Kobomugi fajta vízpotenciálja viszont a 15. napig nem mutatott szignifikáns csökkenést. Összességében ennél a fajtánál a kontrollhoz képest kis mértékű különbségek voltak detektálhatóak. A vízpotenciál változások alapján a Kobomugi közel izohidrikusnak minősül, míg a Cappelle Desprez, GK Öthalom és Plainsman búzafajták a szöveti deszikkáció tolerálásával védekeznek a szárazság ellen.

Polietilén glikollal indukált ozmotikus stressz jelenős (CDNB szubsztráttal detektált) GST aktivitás növekedést okozott hagyma kalluszkultúrában (Rohman és mtsai. 2010). Kísérleteinkben a GST aktivitás ozmotikus stressz hatására a vizsgált búzafajták közül az izohidrikus Kobomugi gyökerében indukálódott legjelentősebben (hasonlóan a kalászos növények zászlóslevelében mért eredményekhez), míg a rezisztens Plainsman esetében a GST aktivitás nem emelkedett meg jelentősen. Egy független kísérletben bebizonyosodott, hogy Plainsman fajta szárazságstressz alatti védekezésének egyik jelentős komponense csíranövény korban az aszkorbát ciklus elemeinek az aktiválása (Secenji és mtsai. 2010a). A Kobomugi és GK Öthalom gyors GST aktivitás emelkedéséhez viszonyítva (9. napon, 2 nappal a 100 mOsm kezelés után) a szenzitív Cappelle Desprez fajta GST aktivitása a 11. naptól emelkedett meg ozmotikus stressz hatására, ami későbbi stresszválaszra, elnyújtott alarm fázisra utal.

Kontroll körülmények között a csíranövények vizsgált GST transzkriptumai között a *TaGSTU2* gén esetében egy esetben figyelhattunk meg folyamatos emelkedést (Plainsman fajta). Ozmotikus stressz hatására szignifikáns indukció mind a négy fajta esetében megfigyelhető volt, és megállapíthattuk, hogy a tau csoportú gének jelentősebb transzkript szint emelkedést mutattak (6.2. táblázat). A GST aktivitás mérésekkel

összhangban a tau csoportú GSTk a legkisebb expresszió növekedést a Plainsman fajtában, a legjelentősebb emelkedést az izohidrikus Kobomugiban és GK Öthalomban mutatták. Ezek az eredmények összhangban vannak Thom és munkatársai (2002) által meghatározott katalitikus aktivitás értékekkel, mely alapján CDNB szubsztráttal szemben a legjelentősebb konjugatív aktivitással a GSTU2 fehérje rendelkezik. A Cappelle Desprez fajta későbbi reakcióját a PEG kezelésre a GST aktivitás lassú indukcióján kívül alátámasztotta a *TaGSTU2* és *TaGSTU1* gének expressziója is.

Fajták	GSTU1B	GSTU1C	GSTU2	GSTF6	GST19E50
Plainsman					
Cappelle Desprez					
Kobomugi					
GK Öthalom					

6.2. táblázat: A vizsgált phi és tau csoportú búza GST gének transzkript szintjeiben ozmotikus stressz hatására bekövetkezett változások egyszerűsített sémája. Jelölések: nem történt szignifikáns változás(□), a relatív egységhez képest tízszeresnél kisebb (▤), harmincszorosnál kisebb (▥), harmincszorosnál nagyobb (■) emelkedést mutatott a transzkript szint.

Összehasonlítva a két kísérletsorozatban kapott eredményeket, a szárazságstressz hatására a kalászos növények zászlóslevelében és az ozmotikus stressz hatására a csíranövények gyökerében stresszre indukálódó GST gének között találtunk átfedéseket (pl: *TaGSTU1B/C* allélok), jelezve, hogy az általuk kódolt fehérjék mind a két stresszválaszban szerepet játszanak, jelentőségük feltehetően általánosabb. Két phi csoportú gén esetén tapasztaltunk eltérő stresszindukciót a különböző életszakaszokban (*TaGSTF6* és *TaGST19E50*), esetükben a kalászos növényekben a szárazság erőteljesebb expressziós emelkedést okozott.

Vízhiány fellépését követően elsőként fokozódik az ABS bioszintézis a gyökérben, majd az ABS a xilémén keresztül a hajtásba transzportálódik, megvalósítva a nagy távolságot áthidaló jelátvitelt a gyökér és a hajtás között (Wilkinson és Davies, 2002). A gyökérben *de novo* szintetizálódó ABS bioszintézis enzimeinek aktivitása a stressz hatására megemelkedik. A xilémén keresztül a levelekbe transzportálódó ABS a

sztomakonduktancia legfontosabb szabályozója és ezáltal a növény párologtatási rátájának meghatározója (Wilkinson és Davies, 2002). A környezeti vízpotenciál csökkenést követően a sztomakonduktancia változás fajtától (Condon és mtsai.1992) és a stresszhatás erősségétől (Rawson és mtsai. 1977) függően variábilis lehet.

A legjelentősebb GST aktivitás növekedést mutató két fajtában, az izohidrikus Kobomugiban és a szöveti deszikkációt toleráló GK Öthalomban meghatároztuk ozmotikus stressz esetén a sztomakonduktancia értékeket, illetve a sztóma nyitott és zárt állapotát szabályozó hormon, az ABS mennyiségi változásait, a bioszintézisének utolsó lépését katalizáló enzim aktivitását. Kobomugi növényeknél a PEG kezelésre megnövekedett ABS termelést bizonyítja a stresszre indukálódó AAO2 izoenzim aktivitás emelkedése a gyökérben. A hajtás és gyökér ABS tartalmának összehasonlításából arra lehet következtetni, hogy Kobomugi esetében a hajtás irányába történő hormon transzport hatékonyabb, mint GK Öthalom esetében. Az ozmotikus stressz hatására a Kobomugi sztomakonduktanciája már az első, 100 mOsm PEG kezelés hatására jelentősen lecsökken, a sztómák bezáródnak. Ezért a megnövekedett hajtás ABS tartalom tehető felelőssé, ami a 13. napon megfigyelhető volt. GK Öthalom fajtánál a gyökérben az AAO2 nem szignifikáns aktivitásváltozása és a kisebb mértékű, hajtásba irányuló ABS transzport feltehetően hatással voltak a sztomaregulációra: a sztomakonduktancia az első PEG kezelés után 5 nappal csökkent le, ami a szöveti deszikkációhoz és vízpotenciálcsökkenéshez vezetett.

A GPOX és GST aktivitás értékei ozmotikus stresszre mindkét fajta hajtásában és gyökérében megemelkedtek, ami a GSTk általános szerepét, illetve a teljes csíranövényre kiterjedő hatékony védekezést jelzi. A GK Öthalom fajta ABS tartalma és GPOX, GST aktivitás időbeni lefutása bizonyos mintavételi pontokon hasonló tendenciát mutatott, míg Kobomugi esetében a lecsökkentő gyökér ABS szinteket nem követte a GPOX, GST aktivitás csökkenése.

6.3. Az ABS bioszintézis gátlás hatása *GSTU1* és *U2* gének expressziójára

Triticum tauschii-ban 100 μ M ABS indukálta a *TtGSTU1* és *U2* expresszióját, amely gének promótere ABRE elemet tartalmaz (Xu et al. 2002). Megvizsgáltuk az általunk tanulmányozott, legerőteljesebb GST indukciókat mutató két fajta esetében a *TaGSTU1* gén két allélja (B,C) és az *U2* gén expressziójának ABS függését, egy ABS bioszintézis gátló molekula, a fluridon felhasználásával. A Kobomugi és GK Öthalom

esetében kapott különböző eredmények a két búzafajta eltérő stratégiájára világítottak rá. A GK Öthalom esetében a vizsgált GST gének közül kettő transzkript szint kialakításának jelentős eleme az ABS. Kobomuginál sem az alap expressziós szintre, sem a stresszre adott indukcióra nem volt jelentős hatással az ABS bioszintézis gátlás, ami ennél a fajtánál ABS független GSTU1C és U2 regulációt feltételez.

Kobomugi esetében az ABS tartalomtól kevésbé függő regulációjú GST izoenzimek lehetővé teszik az ozmotikus stressz során felhalmozódó mérgező metabolitok eltávolítását a gyökér sejtekből, a stresszre *de novo* szintetizálódó ABS nagyfokú hajtásba irányuló xilém transzportja esetén is.

7. Összefoglalás

7.1. Szárazságstressz hatása különböző szárazságtűrűsű búza növények zászlós

leveleinek öregedési folyamatára, fiziológiai paramétereire és GST expressziójára

Hat búzafajta szárazságstresszel szembeni válaszreakcióit vizsgáltuk az antézis után, a korai szemfeltöltődési periódusban. A szemfeltöltődés szempontjából a zászlóslevélnek kiemelkedő szerepe van, ugyanis innen történik a tápanyagtranszport az érésben lévő szemekbe. A zászlóslevél szeneszscenciájának hossza és lefutása a hozam meghatározó tényezője, amit jelentősen befolyásol a szárazságstressz, ezért a hatékony stressz elleni védekezés a zászlóslevélen a hozam meghatározója lehet.

7.1.1. A vizsgált időszakban (korai teljes érési és teljes érési periódusban) három fajta esetében láttuk az öregedési folyamat megindulásának jeleit a szeneszscencia paraméterekben: Mv Emese, Plainsman és Cappelle Desprez. Eredményeink szerint nem jelentkezett szárazság hatására felgyorsult öregedési folyamat, mivel az öntözött és a száraz növények szeneszscencia paramétereinek változása között szignifikáns különbséget nem találtunk.

7.1.2. A korai szemfeltöltődési periódusban az irodalmi adatok alapján várttal ellentétben nem emelkedett a pigmenttartalommal fordított arányban a kivonható össz GST aktivitás az öregedés mérhető jeleit mutató Mv Emese és Cappelle Desprez fajták esetében sem, feltehetően a szignifikáns GST aktivitás indukció csak bizonyos izoenzimeknél jelentkezik és/vagy a normál lefutású szeneszscencia későbbi pontján mutatkozik meg.

7.1.3. Szárazság alatti hozamstabilitás szempontjából a legkiemelkedőbbnek a Plainsman és a Kobomugi bizonyultak. A Plainsman esetében a jól öntözött mintákban mértük a legmagasabb GST, GPOX aktivitás és expresszió értékeket, és szárazság stresszre jelentős indukciót mutattunk ki. A Kobomugi GST aktivitása szárazságra minden mintavételi napon megemelkedett. A legmagasabb GST transzkript szint emelkedéseket stressz hatására ennél a két fajtánál detektáltunk.

7.1.4. Szárazságstressz hatására jelentős indukciókat tapasztaltunk mind phi, mind tau csoportba tartozó gének expressziójában, a búzafajták többségében a legkiemelkedőbb transzkript szint emelkedéseket a *TaGSTF6* és *TaGSTU1B/C* esetében figyeltük meg, ami a gének által kódolt fehérjék stresszválaszban betöltött jelentős szerepére utal. A két, szárazság hatására is változatlan ezerszemtömeget mutató fajta, a Plainsman és Kobomugi, stressz válaszainak különbözősége abban is megmutatkozott, hogy szárazság hatására a phi

és tau csoportokon belül eltérő gének mutattak kiemelkedő indukciót (Kobomugi esetében a *TaGSTU1C*, *TaGSTU19E50*, Plainsmannál a *TaGSTU1B* és *GSTF6*).

7.2. Ozmotikus stressz hatása búza csíranövények fiziológiai paramétereire és GST expressziójára

7.2.1. A növények víz- és ozmotikus stresszel szemben különböző stratégiákat követhetnek, egy részük képes a szöveti vízpotenciál csökkenését tolerálni, míg másik csoportjuk, az izohidrikus növények, a talaj vízpotenciáljának csökkenése ellenére képesek a szövetek vízpotenciálját megőrizni. A vízháztartási paraméterek alapján a Plainsman, Cappelle Desprez és GK Öthalom búzafajták a szöveti deszikkáció tolerálásával védekezőnek, míg Kobomugi izohidrikusnak bizonyult. A legalacsonyabb vízpotenciál és relatív víztartalom változásokat a Plainsman és a Kobomugi mutatta, ennél a két fajtánál volt a vízhiánynak legkisebb hatása az ezerszemtömegre.

7.2.2. A GST aktivitás ozmotikus stressz hatására az izohidrikus Kobomugi gyökerében indukálódott legjelentősebben a többi fajtához viszonyítva (hasonlóan a kalászó növények zászlóslevelében mért eredményekhez), míg a hozam alapján rezisztensnek minősülő Plainsman esetében a GST aktivitás nem emelkedett meg jelentősen. Plainsman fajta szárazságstressz alatti védekezésének egyik jelentős komponense csíranövény korban az aszkorbát ciklus elemeinek az aktiválása (Secenji és mtsai 2010a), ami magyarázhatja az ozmotikus stresszre szinte változatlan GST izoenzimek aktivitását és expresszióját. A szenzitív Cappelle Desprez fajta GST aktivitása és a vizsgált GST gének transzkript szintjei a kalászó növényeken mért adatokkal összhangban lassú stresszválásra utalnak, ami a vízháztartási paraméterek értékeinek, illetve az ezerszemtömegnek a csökkenését okozta. Ozmotikus stressz hatására kiemelkedő GST aktivitás- és expressziós indukciót mutatott a GK Öthalom fajta.

7.2.3. Ozmotikus stressz hatására a tau csoportú gének mind a négy fajta esetében jelentősebb transzkriptszint emelkedést mutattak. Különösen magas értékeket mutatott a kezelés hatására, az irodalmi adatok alapján kiemelkedő CDNB-vel szembeni katalitikus aktivitással rendelkező *TaGSTU2* fehérje mRNS szintje.

7.2.4. Kobomugi hajtás és gyökér ABS tartalma a hormon hatékonyabb hajtás irányú transzportjára utal, mint GK Öthalom esetében. Az ozmotikus stressz hatására a Kobomugi sztómakonduktanciája már a PEG kezelés kezdetén jelentősen lecsökkent az ozmotikus stressznek kitett mintákban, ami a szöveti vízpotenciál megőrzésének fontos

eleme. A megemelkedett ABS tartalom kialakításában mindkét vizsgált búzafajta esetében (Kobomugi és GK Öthalom) szerepet játszott az AAO2-es izoenzim aktivitásának emelkedése a gyökérben.

7.3. Az ABS bioszintézis gátlás hatása *GSTU1* és *U2* gének expressziójára

7.1.3. Az ABS bioszintézis út egyik elemének a gátlása a *TaGSTU1C* és *TaGSTU2* génexpressziót lecsökkentette GK Öthalom fajtában ozmotikus stressz alatt és kontroll körülmények között is. Kobomuginál sem a kontroll esetben, sem PEG kezelés alatt az említett gének expressziójában nem tapasztaltunk szignifikáns változást az ABS bioszintetikus út gátlása után.

Kobomugi esetében az ABS tartalomtól kevésbé függő regulációjú GST izoenzimek lehetővé teszik az ozmotikus stressz során felhalmozódó mérgező metabolitok eltávolítását a gyökér sejtekből a stresszre *de novo* szintetizálódó ABS nagy fokú xilém transzportja esetén is.

8. Summary

8.1. Effects of drought stress on flag leaf senescence, physiological parameters and GST (glutathione transferase) expression of wheat cultivars with different drought susceptibility

The timing of flag leaf senescence is an important factor in grain filling and yield both under stress and optimal conditions. In our experiments flag leaves of six wheat cultivars (MV Emese, GK Élet, Plainsman, Cappelle Desprez, Kobomugi and GK Öthalom) were sampled at four time points starting from anthesis until the 12th day post anthesis (12 DPA), which period covers the premilk stage and the beginning of the medium milk stage. Senescence has attracted attention, particularly in monocarpic plants, such as cereals, especially in the grain filling period. The duration and rate of grain filling determine the final grain weight, which is a key component of the total yield. Water stress during grain filling usually induces early senescence, shortens the grain filling period and increases remobilization of assimilates from the leaves to the grains.

8.1.1. During the premilk and medium milk periods changes were detectable in the senescence parameters of three wheat cultivars: Mv Emese, Plainsman and Cappelle Desprez. According to our results there were no remarkable signs of stress induced acceleration of the senescence in this early grain filling period.

8.1.2. In contrast to data in literature, time-dependent increase of the total extractable GST activity was not detectable in those cultivars, where changes appeared in the senescence parameters. Senescence presumably causes inductions either of other GST isoenzymes, or in a later phase of aging.

8.1.3. Higher rate of yield stability indicates the water stress resistance of Plainsman and Kobomugi. GST and GPOX (glutathione peroxidase) activity and expression of the well-watered flag leaves were the highest in Plainsman cultivar and showed significant induction due to stress. GST activity increased in every sampling day during water deficit in Kobomugi. Drought stress caused the highest elevations in the transcript amounts of the chosen GST genes in Plainsman and Kobomugi.

8.1.4. Drought stress caused high elevations in both phi and tau group GST expressions. The highest increases were detectable in the transcript amount of *TaGSTF6* and *TaGSTU1B/C* in most of the wheat cultivars. These data refer to the important roles of TaGSTF6 and TaGSTU1B/C gene products in the acclimatisation process. There were

differences between stress reactions of Plainsman and Kobomugi (two cultivars with the highest yield stability), among the GST groups different genes were induced due to stress (in case of Kobomugi *TaGSTU1C* and *TaGSTU19E50*, in Plainsman *TaGSTU1B* and *GSTF6*).

8.2. Effects of osmotic stress on the physiological parameters and GST expression of wheat cultivars

8.2.1. The drought- and osmotic stress resistance mechanisms of plants are divided into several types: some of them are able to function while dehydrated (desiccation postponement), others maintain tissue hydration (isohydric plants). The third category, drought escape, comprises plants that complete their life cycle during wet season, before the onset of the drought. According to the water relation parameters, Cappelle Desprez, GK Öthalom and Plainsman cultivars follow the desiccation postponement strategy, while Kobomugi is proved to be isohydric. Plainsman and Kobomugi showed the least changes in water relation parameters.

8.2.2. Osmotic stress caused the highest inductions in GST activity in the root of Kobomugi cultivar. In Plainsman cultivar - which showed also high yield stability - the GST activity was almost unaffected by osmotic stress. According to Secenji et al. (2010), activation of the effective ascorbate cycle is a main component of water stress reactions in Plainsman seedlings, which can be the reason of the slight inductions in GST activity and expression during water deficit. In the sensitive Cappelle Desprez, changes in GST activity and expression in consonance with the flag leaf data indicated slow reaction to stress, which led to decrease in the water relation parameters and thousand grain yield. Osmotic stress caused significant increases in the GST activity and expression in GK Öthalom.

8.2.3. The tau group GSTs were significantly induced due to osmotic stress in all four investigated cultivars. Due to the treatment mRNA content of *TaGSTU2* protein was prominently high. According to the literature, this protein has high conjugating activity towards CDNB substrate.

8.2.4. The ABA (abscisic acid) content of Kobomugi root and shoot indicated more effective ABA transport to the shoot, than in GK Öthalom. The stomatal conductance of Kobomugi decreased immediately after osmotic stress, which had important role in the maintaining of the water potential. Induction of the AAO2 (abscisic aldehyde oxidase 2)

activity in the root might participate in the *de novo* ABA synthesis in both Kobomugi and GK Öthalom cultivars.

8.3. Effects of ABA biosynthesis inhibition on the expression of *GSTU1* and *U2* genes

8.3.1. Inhibition of ABA biosynthesis pathway led to the decrease of the *TaGSTU1C* and *TaGSTU2* gene expression in GK Öthalom cultivar in both control and osmotic stress conditions. In case of Kobomugi, no significant changes were detectable in the expression of the examined gene, neither in the control, nor in the PEG treated samples due to ABA biosynthesis inhibition.

ABA has less importance in the regulation of GST isoenzyme expressions in Kobomugi, than in GK Öthalom. This enables the effective detoxification of osmotic stress induced toxic metabolites in Kobomugi, even when *de novo* synthesized ABA is intensely transported to the shoots.

9. Felhasznált irodalom

- Alfenito MR, Souer E, Goodman CD, Buell R, Mol J, Koes R, Walbot V Functional complementation of anthocyanin sequestration in the vacuole by widely divergent glutathione *S*-transferases. *Plant Cell* 1998;10:1135-1149.
- Alscher R, Amundson R, Cumming J, Fellows S, Fincher J, Rubin G, Van Leuken P. Weinstein L. Seasonal changes in the pigments, carbohydrates and growth of red spruce as affected by ozone. *New Phytol* 1989;113:211–223.
- Awasthi YC, Beutler E, Srivastava SK. Purification and properties of human erythrocyte glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1975;250:5144-5149.
- Banerjee S, Goswami R. GST profile expression study in some selected plants: *in silico* approach *Mol Cell Biochem* 2010;DOI 10.1007/s11010-009-0258-3.
- Basantani M, Srivastava A. Plant glutathione transferases – a decade falls short. *Can J Botany* 2007;85:443-456.
- Board PG, Baker RT, Chelvanayagam G, Jermin LS. Zeta, a novel class of glutathione transferases in a range of species from plants to humans. 1997;328:929-935.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976;72:248-254.
- Bray AE, Bailey-Serres J, Weretilnyk E. Responses to abiotic stresses. In: Buchanan B, Gruissem W, Jones Reditors. *Biochemistry and molecular biology of plants*. Rockville, MD: American Society of Plant Physiologists 2000;1158–202.
- Büssis D, Kauder F, Heineke D. Acclimation of potato plants to polyethylene glycol-induced water deficit I. Photosynthesis and metabolism. *J Exp Bot* 1998;49:1349-1360.

- Carter C, Pan S, Zouhar J, Avila EL, Girke T, Raikhel NV. The vegetative vacuole proteome of *Arabidopsis thaliana* reveals predicted and unexpected proteins. The Plant Cell 2004;16:3285–3303.
- Chen W, Singh KB. The auxin, hydrogen peroxide and salicylic acid induced expression of the *Arabidopsis GST6* promoter is mediated in part by an ocs element. Plant J 1999;19:667–677.
- Chen D, Kawarasaki Y, Nakano H, Yamane H. Cloning and *in vitro* and *in vivo* expression of plant glutathione S-transferase zeta class genes. J Biosci Bioeng 2003;95:594-600.
- Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem 1987;162:156-159.
- Condon AG, Richards RA; Farquhar GD. The effect of variation in soil water availability, vapor pressure deficit and nitrogen nutrition on carbon isotope discrimination in wheat. Aust J Agric Res 1992;43:935-947.
- Cowan A. K. Is abscisic aldehyde really the intermediate precursor to stress-induced ABA? Trends Plant Sci 2000;5,1360-1385.
- Cummins I, Cole DJ, R. Edwards. A role for glutathion transferases functioning as glutathione peroxidase in resistance to multiple herbicides in black-grass, Plant J 1999;18:285–292.
- Cummins I, O'Hagan D, Jablonkai I, Cole DJ, Hehn A, Werck-Reichhart D, Edwards R. Cloning, characterization and regulation of a family of phi class glutathione transferases from wheat. Plant Mol Biol 2003;52:591-603.
- Cutler AJ, Krochko JE. Formation and breakdown of ABA. Trends Plant Sci 1999;4:472-478.

- Csiszár J, Szabó M, Erdei L, Márton L, Horváth F, Tari I. Auxin autotrophic tobacco callus tissue resist oxidative stress: the importance of the glutathione S-transferase and peroxidase activities in auxin heterotrophic and autotrophic calli. *J Plant Physiol* 2004;161:691-699.
- Dean JD, Goodwin PH, Hsiang T. Induction of glutathione S-transferase genes of *Nicotiana benthamiana* following infection by *Colletotrichum destructivum* and *C. orbiculare* and involvement of one in resistance. *J Exp Bot* 2005;56:1525-1533.
- DeRidder BP, Dixon DP, Beussman DJ, Edwards R, Goldsbrough PB. Induction of Glutathione S-Transferases in *Arabidopsis* by Herbicide Safeners *Plant Physiol* 2002;130:1497-1505.
- Dixon DP, Laphorn A and Edwards R. Plant glutathione transferases. Protein family review. *Genome Biol* 2002a;3:3004.1-3004.10.
- Dixon DP, Davis BG, Edwards R. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. *J Biol Chem* 2002b;277:30859-30869.
- Dixon DP, Edwards R. Enzymes of tyrosine catabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci* 2006;171:360–366.
- Dixon DP, Laphorn A, Madesis P, Mudd EA, Day A, Edwards R. Binding and glutathione conjugation of porphyrinogens by plant glutathione transferases. *J Biol Chem* 2008;283:20268-20276.
- Droog F, Spek A, van der Kooy A, de Ruyter A, Hoge H, Libbenga K, Hooykaas P, van der Zaal B. Promoter analysis of the auxinregulated tobacco glutathione S-transferase genes *Nt103-1* and *Nt103-35*. *Plant Mol Biol* 1995;29:413–429.
- Dudits D, Heszky L. Abiotikus stressz-rezisztens transzgénikus növények. In: Dudits D, Heszky L. Növényi biotechnológia és géntechnológia. Agroinform Kiadó, Budapest 2003;234-252.

- Dudler R, Hertig C, Rebmann G, Bull J, Mauch F. A pathogen-induced wheat gene encodes a protein homologous to glutathione-S-transferases. *Mol Plant Microbe Int* 1991;4:14-18.
- Ederli L, Pasqualini S, Batini P, Antonielli M. Photoinhibition and oxidative stress: effects on xanthophylls cycle, scavenger enzymes and abscisic content in tobacco plants. *J Plant Physiol* 1997;151:422-428.
- Edwards R, Dixon DP, Walbot V. Plant glutathione S-transferases: enzymes with multiple functions in sickness and in health. *Trends Plant Sci* 2000;5:193-198.
- Edwards R, Dixon DP. Plant glutathione transferases. *Methods Enzymol* 2005;41:169-186.
- Ford CM, Boss PK, Hoj PB. Cloning and characterization of *Vitis vinifera* UDP-glucose:flavonoid 3-*O*-glucosyltransferase, a homologue of the enzyme encoded by the maize *Bronze-1* locus that may primarily serve to glucosylate anthocyanidins *in vivo*. *J Biol Chem* 1998;273:9224–9233.
- Foyer CH, Noctor G. Oxidant and antioxidant signaling in plants: a re-evaluation of the concept of oxidative stress in a physiological context. *Plant Cell Environ* 2005;29:1056-1071.
- Frear DS, Swanson HR. Biosynthesis of S-(4-ethylamino-6-isopropylamino-2S-triazine) glutathione: partial purification and properties of glutathione S-transferase from corn. *Phytochem* 1970;9:2123–2132.
- Galau GA, Hughes DW, Dure L. Absciscic acid induction of cloned cotton late embryogenesis-abundant (Leu) mRNAs. *Plant Mol Biol* 1986;7:155-170.
- George S, Venkataraman G, Parida A. A chloroplast-localized and auxin-induced glutathione S-transferase from phreatophyte *Prosopis juliflora* confer drought tolerance on tobacco. *J Plant Phys* 2010;167:311-318.

- Goetzberger C, Andrews CJ, Jepson I, Eulitz M, Sandermann H, Schroeder P. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a glutathione S-transferase (Accession No. AF184059) from wheat with activity towards the herbicide fenoxaprop-ethyl (PGR 00-008). *Plant Physiol* 2000;122:292.
- Gómez-Candenas A, Verhey SD, Holappa LD, Shen Q, Ho TD, Walker-Simmons MK. An abscisic acid-induced protein kinase, PKABA1, mediates abscisic acid-suppressed gene expression in barley aleurone layers. *Plant Physiol* 1998;22:131-160.
- Gregersen PL, Holm PB. Transcriptome analysis of senescence in the flag leaf of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Biotechnol J* 2007;5:192-206.
- Guóth A, Tari I, Gallé Á, Csiszár J, Pécsváradi A, Cseuz L, Erdei L. Comparison of the drought stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: changes in flag leaf photosynthetic activity, ABA levels and grain yield. *J Plant Growth Reg* 2009;28:167–176.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem* 1974;246:7130-7139.
- Hartung W, Peuke AD, Davies WJ. Abscisic acid—a hormonal long distance stress signal in plants under drought and salt stress. Pessarakali M, ed. *Handbook of crop stress*, 2nd edn. New York, NY: Marcel Dekker 1999;731–747.
- Hartung W, Sauter A, Hose E. Abscisic acid in the xylem: where does it come from, where does it go to? *J Exp Bot* 2002;53:27–33.
- Heazlewood JL, Tonti-Filippini JS, Gout AM, Day DA, Whelan J, Millar AH. Experimental analysis of the arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *The Plant Cell* 2004;16:241–256.

- Hideg É, Csiszár J, Horváth VG, Erdei L. Az oxidatív stressz és aszálykárok In: A búza nemesítésének tudománya, A funkcionális genomikától a vetőmagig Szerk.: Dudits Dénes . MTA Szegedi Biológiai Központ – Winter Fair, 2006.
- Hille R. The mononuclear molybdenum enzymes. Chem Rev 1996;96:2757-2916.
- Itzhaki H, Maxson JM, Woodson WR. An ethylene-responsive enhancer element is involved in the senescence-related expression of the carnation glutathione-S-transferase (GST1) gene. Plant Biol 1994;91:8925-8929.
- Jukanti AK, Bruckner PL, Fischer AM. Molecular and biochemical characterisation of polyphenol oxidases in developing kernels and senescing leaves of wheat (*Triticum aestivum*). Funct Plant Biol 2006;33:685-696.
- Kampranis SC, Damianova R, Atallah M, Toby G, Kondi G, Tsihli PN Makris AM. A novel plant glutathione S-transferase/peroxidase suppresses Bax lethality in yeast. J Biol Chem 2000;275:29207-29216.
- Karpenstein-Machan M., Maschka R.. Untersuchungen zum Ertragsaufbau und zur Standorteignung von Triticale, Hybrid- und Populationsroggen auf der Basis der Landessortenversuche, Agribiol Res 1996;49:130-143.
- Kilili KG, Atanassova N, Vardanyan A, Clatot N, Al-Sabarna K, Kanellopoulos PN, Makris AM, Kampranis SC. Differential roles of tau class glutathione S-transferases in oxidative stress. J Biol Chem 2004;279:24540-24551.
- Kieffer P, Schröder P, Dommès J, Hoffmann L, Renaut J, Hausman JF. Proteomic and enzymatic response of poplar to cadmium stress. J Proteomics 2009;72(3):379-96.
- Kocsy G, Kobrehel K, Szalai G, Duviau M-P, Buzás Z, Galiba G. Thioredoxin h and glutathione as abiotic stress tolerance markers in maize. Environ Exp Bot 2004;52:1001-112.

- Kunieda T, Fujiwara T, Amano T, Shioi Y. Molecular cloning and characterization of a senescence-induced tau-class glutathione *S*-transferase from barley leaves. *Plant Cell Physiol* 2005;46:1540-1548.
- Kuźniak E, Skłodowska M. Ascorbate, glutathione and related enzymes in chloroplasts of tomato leaves infected by *Botrytis cinerea*. *Plant Sci* 2001;160:723-731.
- Larcher W. *Ökophysiologie der Pflanzen*. Stuttgart, Eugen Ulmer Verlag 1994.
- Lichtenthaler HK, Wellburn AR. Determination of carotenoids and chlorophyll a and b of leaf extracts in different solvents. *Biochem Soc T* 1983;11:591-592.
- Lindermayr C, Saalbach G, Durner J. Proteomic Identification of *S*-Nitrosylated Proteins in *Arabidopsis*. *Plant Phys* 2005;137:921-930.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods* 2001;25:402-408.
- Loyall L, Uchida K, Braun S, Furuya M, Frohnmeier H. Glutathione and UV-light induced glutathione *S*-transferase are involved in signalling to chalcone synthase in cell cultures. *Plant Cell* 2000;12:1939-1950.
- Marrs KA, Alfenito MR, Lloyd AM, Walbot V. A glutathione *S*-transferase involved in vacuolar transfer encoded by the maize gene *Bronze-2*. *Nature* 1995;375:397-400.
- Marrs KA. The function and regulation of glutathione *S*-transferases in plants. *Annu Rev Plant Phys* 1996;47:127-158.
- Mauch F, Hertig C, Rebmann G, Bull J, Dudler R. A wheat glutathione-*S*-transferase gene with transposon-like sequences in the promoter region. *Plant Mol Biol* 1991;16:1089-1091.
- May MJ, Vernoux T, Leaver C, Van Montagu M, Inzé D. Glutathione homeostasis in plants: implications for environmental sensing and plant development. *J Exp Bot* 1998;49:649-667.

- Miller G, Suzuki N, Ciftci-Yilmaz, Mittler R. Reactive oxygen species homeostasis and signalling during drought and salinity stresses. *Plant Cell Environ* 2010;33:453-467.
- Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci* 2004;9:490–498.
- Moons A Osgstu3 and osgstu4 encoding tau class glutathione S-transferases are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots. *FEBS Lett* 2003;553:427–432.
- Mueller LA, Goodman CD, Silady RA, Walbot V. AN9, a *Petunia* Glutathione S-Transferase Required for Anthocyanin Sequestration, Is a Flavonoid-Binding Protein *Plant Phys* 2000;123:1561–1570.
- Noctor G, Foyer CH. A re-evaluation of the ATP:NADPH budget during C₃ photosynthesis. A contribution from nitrate assimilation and its associated respiratory activity? *J Exp Bot* 1998;49,1895–1908.
- Noctor G, Gomez L, Vanacker H, Foyer CH. Interactions between biosynthesis, compartmentation and transport in the control of glutathione homeostasis and signalling. *J Exp Bot* 2002;53:1283-1304.
- Omarov R, Dräger D, Tischner R, Lips H. Aldehyde oxidase isoforms and subunit composition in roots of barley as affected by ammonium and nitrate. *Physiol Plant* 2003;117:337-342.
- Pan L, Kawai M, Yu LH, Kim KM, Hirata A, Umeda M, Uchimiya H. The *Arabidopsis thaliana* ethylene-responsive element binding protein (*AtEBP*) can function as a dominant suppressor of Bax-induced cell death of yeast. *FEBS Lett* 2001;508:375-378.
- Pascal S, Scalla R. Purification and characterization of a safener-induced glutathione S-transferase from wheat (*Triticum aestivum*). *Physiol Plant* 1999;106:17-27.

- Quarrie SA, Jones HG. Genotypic variation in leaf water potencial, stomatal conductance, and abscisic acid concentrations in spring wheat subjected to artificial drought stress. *Ann Bot* 1979;44:323-332.
- Quick WP, Chaves MM, Wendler R, David MM, Rodrigues ML, Passarinho JA, Pereira JS, Adcok MD, Leegood RC, Stitt M. The effect of water stress on photosynthetic carbon metabolism in four species grown under field conditions. *Plant, Cell Environ.* 1992;15:25-35.
- Rawson H.M., Begg JE, Woodward RG. The effect of atmospheric humidity on photosynthesis, transpiration and water use efficiency of leaves of several plant species, *Planta* 1977;134:5-10.
- Roxas VP, Smith RK, Allen ER, Allen RD. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathioneperoxidase enhances the growth of transgenic tobacco during stress. *Nat Biotechnol* 1997;15:988-991.
- Roxas VP, Lodhi SA, Garrett DK, Mahan JR, Allen RD. Stress tolerance in transgenic tobacco seedlings that overexpress glutathione S-transferase/glutathione peroxidase. *Plant Cell Physiol* 2000;41:1229-1234.
- Rohman MM, Uddin MS, Fujita M. Up-regulation of onion bulb glutathione S-transferases (GSTs) by abiotic stresses: A comparative study between two differently sensitive GSTs to their physiological inhibitors. *POJ* 2010;3:28-34.
- Sagi M, Omarov RT, Lips SH. The Mo-hydroxylases xanthine dehydrogenase and aldehyde oxidase in ryegrass as affected by nitrogen and salinity. *Plant Sci* 1998;135:125-135.
- Sappl PG, Sanchez L, Singh KB, Millar AH. Proteomic analysis of glutathione S-transferases of *Arabidopsis thaliana* reveals differential salicylic acid induced expression of plant-specific phi and tau classes. *Plant Mol Biol* 2004;54:205-219.

- Secenji M, Hideg E, Bebes A, Györgyey J. Transcriptional differences in gene families of the ascorbate–glutathione cycle in wheat during mild water deficit. *Plant Cell Rep* 2010a;29:37–50.
- Secenji M, Lendvai A, Miskolczi P, Kocsy G, Galle A, Szucs A, Hoffmann B, Sarvari E, Schweizer P, Stein N, Dudits D, Gyorgyey J. Differences in root functions during long-term drought adaptation: comparison of active gene sets of two wheat genotypes. *Plant Biol* 2010b DOI:10.1111/j.1438-8677.2009.00295.x
- Serrato AJ, Perez-Ruiz JM, Spinola MC, Cejudo FJ. A novel NADPH thioredoxin reductase, localized in the chloroplast, which deficiency causes hypersensitivity to abiotic stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem* 2004;279:43821–43827.
- Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Molecular responses to dehydration and low temperature: differences and crosstalk between two stress signalling pathways. *Curr Opin Plant Biol* 2000;3:217-223.
- Smith AP, Nourizadeh SD, Peer WA, Xu J, Bandyopadhyay A, Murphy AS, Goldsbrough PB. *Arabidopsis AtGSTF2* is regulated by ethylene and auxin, and encodes a glutathione S-transferase that interacts with flavonoids. *Plant J* 2003;36:433–442.
- Soranzo N, Mizzi L, De Toma G, Sari-Gorla M, Frova C. Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family. *Mol Genet Genomics* 2004;271:511-521.
- Subramaniam K, Ye Z, Buechley G, Shaner G, Solomos T, Ueng P P. Isolation of a zeta class wheat glutathione S-transferase gene. *Biochim Biophys Acta* 1999;1447:348-356.
- Szabó M, Az abszcizinsav anyagcseréje. In: Csiszár J, Erdei L, Pécsváradi A, Szabó M, Tari I. *Növényélettan* 2004;242-246.

- Szalai G, Kellős T, Galiba G, Kocsy G. Glutathione as an antioxidant and regulatory molecule in plants subjected to abiotic stresses. *J Plant Growth Regul* 2009;28:66–80.
- Székely G, Abraham E, Cseplo A, Rigo G, Zsigmond L, Csiszar J, Ayaydin F, Strizhov N, Jasik J, Schmelzer E, Koncz C, Szabados L. Duplicated *P5CS* genes of *Arabidopsis* play distinct roles in stress regulation and developmental control of proline biosynthesis. *Plant J* 2008;53:11–28.
- Szigeti Z. Növények és a stressz. In: Növényélettan. A növényi anyagcsere II. kötet. Szerk: Láng Ferenc ELTE Eötvös Kiadó 1998;915-983.
- Tardieu F, Zhang J, Katerji N, Bethenod O, Palmer S, Davies WJ. Xylem ABA controls the stomatal conductance of field-grown maize subjected to soil compaction or soil drying. *Plant Cell Environ* 2006;15:193-197.
- Tari I, Szalai G, Lőrincz Zs, Bálint A. Changes in thiol content in roots of wheat cultivars exposed to copper stress. *Biol Plant* 2002;45:255-260.
- Tari I, Csiszár J, Gallé Á, Bajkán Sz, Szepesi Á, Vashegyi Á. Élettani megközelítések gazdasági növényeink szárazságtűrésének genetikai transzformációval történő javítására. *Bot Közlem* 2003;90:113-132.
- Thatcher LF, Carrie C, Andersson CR, Sivasithamparam K, Whelan J, Singh KB. Differential gene expression and subcellular targeting of *Arabidopsis* glutathione S-transferase F8 is achieved through alternative transcription start sites. *J Biol Chem* 2007;282:28915–28928.
- Theodoulou FL, Clark IM, He XL, Pallett KE, Cole DJ, Hallahan DL. Xenobiotics induce glutathione transferases and multidrug resistance associated protein in wheat. *Pest Manag Sci* 2003;59:202-214.

- Thom R, Cummins I, Dixon DP, Edwards R, Cole DJ, Lapthorn AJ. Structure of a tau class glutathione S-transferase from wheat active in herbicide detoxification. *Biochemistry-US* 2002;41:7008-7020.
- Uchida K. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress. *Prog Lipid Res* 2003;42:318-343.
- Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T. The *ocs* element in the soybean *GH2/4* promoter is activated by both active and inactive auxin and salicylic acid analogues. *Plant Mol Biol* 1994;26:1055–1064.
- Ulmasov T, Ohmiya A, Hagen G, Guilfoyle T. The soybean *GH2/4* gene that encodes a glutathione S-transferase has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents. *Plant Physiol* 1995;108:919-927.
- Wagner U, Edwards R, Dixon DP, Mauch F. Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family. *Plant Mol Biol* 2002;49:515-532.
- Weiler EW, Jourdans PS, Conrad W. Levels of Indole-3-acetic acid in intact and decapitated coleoptiles as determined by a specific and highly sensitive solid-phase enzyme immunoassay. *Planta* 1981;153:561-571.
- Wilkinson S, Davies WJ. ABA-based chemical signalling: the co-ordination of responses to stress in plants. *Plant Cell Environ* 2002;25:195–210.
- Wingate VPM, Lawton MA, Lamb CJ. Glutathione causes a massive and selective induction of plant defense genes. *Plant Phys* 1988;87,206–210.
- Woo HR, Kim JH, Nam HG and Lim PY. The delayed leaf senescence mutants of *Arabidopsis*, *ore1*, *ore3*, and *ore9* are tolerant to oxidative stress. *Plant Cell Phys* 2004;45:923-932.
- Xiong L, Zhu JK. Molecular and genetic aspects of plant responses to osmotic stress. *Plant Cell Environ* 2002;25:131–139.

- Xu FX, Lagudah ES, Moose SP, Riechers DE. Tandemly duplicated safener-induced glutathione S-transferase genes from *Triticum tauschii* contribute to genome- and organspecific expression in hexaploid wheat. *Plant Physiol* 2002;130:362-373.
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L. Water deficit induced senescence and its relationship to the remobilization of pre-stored carbon in wheat during grain filling. *Agron J* 2001;93:196-206.
- Yang J, Zhang J, Wang Z, Zhu Q, Liu L. Involvement of abscisic acid and cytokinins in the senescence and remobilization of carbon reserves in wheat subjected to water stress during grain filling. *Plant Cell Environ* 2003;26:1621-1631.
- Yang J, Zhang J. Grain-filling of cereals under soil drying. *New Phytol* 2006;169:223-236.
- Zdunek E, Lips H. Transport and accumulation rates of abscisic acid and aldehyde oxidase activity in *Pisum sativum* L. in response to suboptimal growth conditions. *J Exp Bot* 2001;359:1269-1276.
- Zybailov B, Rutschow H, Friso G, Rudella A, Emanuelsson O, Sun Q, van Wijk KJ. Sorting signals, N-terminal modifications and abundance of the chloroplast proteome. *PLoS ONE* 2008;3:1994.

10. Publikációs lista

1. **Gallé Á**, Csiszár J, Secenji M, Guóth A, Cseuz L, Tari I, Györgyey J, Erdei L. Glutathione transferase activity and expression patterns during grain filling in flag leaves of wheat genotypes differing in drought tolerance: Response to water deficit J Plant Physiol 2009;166:1878-1891. **IF: 2,456**
2. Guóth A, Tari I, **Gallé Á**, Csiszár J, Pécsváradi A, Cseuz L, Erdei L. Comparison of the drought stress responses of tolerant and sensitive wheat cultivars during grain filling: changes in flag leaf photosynthetic activity, ABA levels and grain yield. J Plant Growth Reg 2009;28:167–176. **IF: 2,109**
3. Sečenji M, Lendvai Á, Miskolczi P, Kocsy G, **Gallé Á**, Szűcs A, Hoffmann B, Sárvári É, Schweizer P, Stein N, Dudits D, Györgyey J. Differences in root functions during long-term drought adaptation: comparison of active gene sets of two wheat genotypes. Plant Biol DOI:10.1111/j.1438-8677.2009.00295.x **IF : 1.944**
4. Guóth A, Benyó D, Csiszár J, **Gallé Á**, Horváth F, Cseuz L, Erdei L, Tari I. Relationship between osmotic stress-induced abscisic acid accumulation, biomass production and plant growth in drought tolerant and sensitive wheat genotypes. Acta Physiol Plant DOI: 10.1007/s11738-009-0453-6 **IF: 0.807**
5. Tari I, Kiss Gy, Deér AK, Csiszár J, Erdei L, **Gallé Á**, Gémes K, Horváth F, Poór P, Szepesi Á, Simon LM Salicylic acid-induced increases in aldose reductase activity and sorbitol accumulation in tomato plants under salt stress. Biol Plantarum 2010 (accepted) **IF (2008) 1.426**
6. Guóth A, Tari I, **Gallé Á**, Csiszár J, Horváth F, Pécsváradi A, Cseuz L, Erdei L. Chlorophyll *a* fluorescence induction parameters of flag leaves characterize genotypes and not the drought tolerance of wheat during grain filling under water deficit. Acta Biol Szeged, 2009;53(1)1-7.
7. Szepesi Á, Csiszár J, **Gallé Á**, Gémes K, Tari I. Effects of long-term salicylic acid pre-treatment on tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill. L. cvar. Rio Fuego) under salt stress tolerance: changes in glutathione S-transferase activities and anthocyanin contents. Acta Agron Hung 2008;58:129-138.
8. Csiszár J, Lantos E, Tari I, Madoşă E, Wodala B, Vashegyi Á, Horváth F, Pécsváradi A, Szabó M, Bartha B, **Gallé Á**, Lazăr A, Coradini G, Staicu M, Postelnicu S, Mihacea S, Nedelea G, Erdei L. Antioxidant enzyme activities in *Allium* species and their cultivars under water stress. Plant Soil Environ 2007;53:517-523.
9. Tari I, Csiszár J, **Gallé Á**, Bajkán Sz, Szepesi Á, Vashegyi Á. Élettani megközelítések gazdasági növényeink szárazságtűrésének genetikai transzformációval történő javítására. Bot Közlem 2003;90:113-132.

Tudományos folyóiratban megjelent konferencia absztraktok

1. **Gallé Á**, Csiszár J, Secenji M, Tari I, Guóth A, Györgyey J, Erdei L.: Monitoring the levels of phi and tau group GST genes in wheat cultivars under osmotic stress. *Acta Biol Szeged* 2008;52:95-96.
2. Guóth A, Tari I, **Gallé Á**, Csiszár J, Cseuz L, Erdei L. Changes in photosynthetic performance and ABA levels under osmotic stress in drought tolerant and sensitive wheat genotypes. *Acta Biol Szeged* 2008;52:91-92.
3. **Gallé Á**, Csiszár J, Secenji M, Tari I, Györgyey J, Dudits D, Erdei L. Changes of glutathione S-transferase activities and gene expression in *Triticum aestivum* during polyethylene-glycol induced osmotic stress. *Acta Biol Szeged* 2005;49:95-96.
4. Csiszár J, Fehér-Juhász E, Kótai É, Ivankovits-Kiss O, Horváth GV, Mai A, **Gallé Á**, Tari I, Pauk J, Dudits D, Erdei L. Effect of osmotic stress on antioxidant enzyme activities in transgenic wheat calli bearing *MsALR* gene. *Acta Biol Szeged* 2005;49:49-50.
5. **Gallé Á**, Csiszár J, Tari I, Erdei L. Changes in water and chlorophyll fluorescence parameters under osmotic stress in wheat cultivars. *Acta Biol Szeged* 2002;46:85-86.

Egyéb kiadványban megjelent konferencia absztraktok

1. Csiszár J, Poór P, **Gallé Á**, Benyó D, Horváth E, Kolbert Zs, Erdei L, Tari I. (2010) Role of H₂O₂, NO and peroxidases in the elongation growth of roots. International Conference on Molecular Aspects of Plant Development, 23-26. February, 2010, Vienna, Austria, Book of Abstracts, pp. 45.
2. **Gallé Á**, Csiszár J, Bartha B, Erdei L. The effect of heavy metal stress on GST activity and transcript amounts of GST and ABC transporter genes in *Brassica juncea*. 16-17 April 2009, COST Action 859 – WG1 & WG2 Workshop and MC Meeting Szeged
3. Csiszár J, **Gallé Á**, Guóth A, Erdei L, Tari I. Different reactions in root growth and peroxidase activities in root segments of wheat genotypes under osmotic stress. International Conference on Plant Abiotic Stress Tolerance, 8-11. February, 2009, Vienna, Austria, Book of Abstracts, pp. 89.
4. **Gallé Á**, Csiszár J, Secenji M, Guóth A, Tari I, Györgyey J, Erdei L. GST (glutathione S-transferase) aktivitás- és génexpressziós vizsgálatok ozmotikus stressznek kitett búza növényeken. IX. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, 2008. július 7-9
5. Guóth A., Tari I., **Gallé Á.**, Csiszár J., Cseuz L., Erdei L. Fotoszintetikus hatékonyság és ABS tartalom változása ozmotikus stressz hatására szárazságtűrő és szenzitív búza genotípusokban. IX. Magyar Növénybiológiai Kongresszus, Szeged, 2008. július 7-9. 2008
6. Guóth A., Tari I., **Gallé Á.**, Csiszár J., Pécsváradi A, Cseuz L., Erdei L. Drought response strategies under grain filling in wheat. Changes in photosynthesis, ABA levels and grain yield. XVI. Congress of FESPB Federation of European Societies of Plant Biology, 17-22. August, 2008, Tampere, Finland, Abstract book, pp.134 2008

7. **Gallé Á.**, Csiszár J., Secenji M., Tari I., Guóth A., Dudits D., Györgyey J., Erdei L. Studies on glutathione S-transferase activities and gene expression levels in *Triticum aestivum* cultivars during polyethylene glycol-induced osmotic stress. 2nd World Conference of Stress, 23-26 August, Budapest, Hungary, Book of Abstracts, pp. 151. 2007
8. Guóth A., Tari I., **Gallé Á.**, Csiszár J., Cseúz L., Erdei L. Comparison of changes in photosynthesis, chlorophyll fluorescence parameters and abscisic acid levels in wheat cultivars under drought stress during grain filling and in seedlings under osmotic stress. 2nd World Conference of Stress, 23-26 August, Budapest, Hungary, Book of Abstracts, pp. 214. 2007
9. **Gallé Á.**, Csiszár J., Secenji M., Tari I., Guóth A., Dudits D., Györgyey J., Erdei L. Studies on glutathione S-transferase activities and gene expression levels in *Triticum aestivum* cultivars during polyethylene glycol-induced osmotic stress. 9th International Symposium Interdisciplinary Regional Research ISIRR, Novi Sad, 37 2007
10. **Gallé Á.**, Csiszár J., Tari I., Erdei L. Induction of senescence during grain filling in wheat cultivars due to water stress. 3th EPSO Conference, Visegrád, Hungary, 2006. 184.
11. Csiszár J., Tari I., **Gallé Á.**, Lendvai Á., Miskolczi P., Secenji M., Király É., Györgyey J., Erdei L. The role of glutathione S-transferases in the drought stress tolerance of different wheat genotypes. XVII. International Botanical Congress, Vienna, Austria, 17-23 July 2005
12. Tari I., Csiszár J., **Gallé Á.**, Bartha B., Horváth F., Pécsváradi A., Szepesi Á., Zeller D., Erdei L. The role of ABA and NO in the drought stress acclimatisation mechanisms of wheat genotypes. XVII. International Botanical Congress, Vienna, Austria, 17-23 July 2005
13. Csiszár J., Tari I., **Gallé Á.**, Király É., Erdei L. Investigation of drought tolerance of wheat varieties: the importance of glutathione S-transferase and peroxidase activities. Acta Physiol Plant 26: S 194 2004

IF: 0,438

Egyéb közlemények

1. Csiszár J., Guóth A., Kolbert Zs., **Gallé Á.**, Tari I. Starch content and α -amylase activities in different wheat cultivars. Zárójelentés. 56-65. old. Magyarország-Románia INTERREG IIIA Határon Átnyúló Együttműködési Programkomponens (projekt szám: HURO-06-02/006) 2008
2. **Gallé Á.**, Csiszár J., Secenji M., Tari I., Györgyey J., Dudits D., Erdei L. Changes of glutathione S-transferase activities and gene expression in *Triticum aestivum* during polyethylene-glycol induced osmotic stress. Képzés és innováció a növénybiológiai felsőoktatásban SZTE Növényélettani Tanszék: 151-162 2006
3. Csiszár J., Tari I., **Gallé Á.**, Király É., Sija É., Pécsváradi A., Erdei L. Antioxidative responses of wheat varieties with different drought stress tolerance under osmotic stress. Képzés és innováció a növénybiológiai felsőoktatásban SZTE Növényélettani Tanszék: 136-150 2006

11. Köszönetnyilvánítás

Szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, *Dr. Csiszár Jolánnak*, rendkívüli kitartásáért, sok-sok segítségéért és támogatásáért mind szakmai, mind személyes vonatkozásokban.

Hálával tartozom *Dr. Tari Irma Tanárnőnek* az évek során nyújtott fáradhatatlan szakmai és emberi támogatásáért és az ösztönző tanácsaiért, ami lendületet adott a munkám elvégzésében.

Köszönetet szeretnék mondani *Dr. Erdei László Tanár Úrnak*, aki lehetővé tette, hogy a munkámat a Szegedi Tudományegyetem Növénybiológiai Tanszékén végezhessem, és állandó támogatásával segítette a munkámat.

Köszönöm *Dr. Györgyey Jánosnak* a munkám minden szakaszában nyújtott felbecsülhetetlen segítségét, amit szakmai tanácsaival nyújtott és a támogató, kedves hozzáállását!

Külön köszönet illeti *Szécsényi Mária* barátnőmet, aki a módszerek megismerésében és használatában kitartó segítséget nyújtott, és akitől az élet minden területén sok támogatást kaptam!

Szeretném megköszönni a baráti és szakmai támogatását tématársamnak, *Forgóné Guóth Adriennek*, aki mind személyesen, mind szakmailag rengeteg segítséget nyújtott!

Hálás vagyok a *PhD szoba minden lelkes egykori és jelenlegi dolgozójának*, akik munkám során végig minden területen támogattak és segítettek!

Köszönettel tartozom a *Növénybiológiai Tanszéken dolgozó asszisztenseknek* a támogató hangulatért és a munkám során nyújtott segítségért!

És a *Növénybiológiai Tanszék* minden munkatársának meg szeretném köszönni a jó hangulatot, a támogató légkört, amelyben jó volt dolgozni, és a sok segítséget, amit nyújtottak.

Szeretném megköszönni a szegedi Gabonatermesztési Kutatóintézet munkatársainak, *Dr. Cseuz Lászlónak és Kovácsné Eszternek* a kísérletekhez biztosított növényi anyagot.

A munkám elvégzésében rendkívüli segítséget nyújtott három pályázat: **NKFP** Búza konzorcium (Ny. Sz.: 4/038/2001), a **NKFP** Búzakalászható konzorcium (Ny. Sz.: 4/038/2001) és **NKTH KPI NAP** (Ny. Sz.: 2006ALAP3-01435/2006), amelyekben a részvételért szeretnék köszönetet mondani a konzorciumok vezetőjének, *Dr. Dudits Dénesnek*.

Végül, de nem utolsó sorban őszinte hálával tartozom a *családomnak* az évek során nyújtott sok-sok támogatásukért, türelmükért, gondoskodásukért és kitartásukért!